UNTERSUCHUNGEN

ÜBER

NORWEGISCHE MUCORINEEN

II

VON

OSCAR HAGEM

(Videnskabs-Selskabets Skrifter. I. Mathem.-Naturv. Klasse. 1910. No. 4)

UDGIVET FOR FRIDTJOF NANSENS FOND

CHRISTIANIA
IN COMMISSION BEI JACOB DYBWAD
1910

Fremlagt i Fællesmødet den 3die December 1909 ved Professor Dr. H. H. Gran.

A. W. BRØGGERS BOGTRYKKERI.

Vorwort.

Die hier vorliegende Arbeit bringt die Fortsetzung meiner seit mehreren Jahren laufenden Untersuchungen über die Erdboden-Mucorineen, derer ersten Teil als „Untersuchungen über norwegische Mucorineen I“ schon vor zwei Jahren publiziert wurde (Videnskabs-Selskabets Skrifter. I. Math.-Naturv. Klasse. 1907. — Kristiania).

In dieser ersten Abhandlung wurde eine Übersicht über die Verbreitung der Mucorineen im Erdbodon gegeben und die verschiedenen Erdboden-Arten mit Rücksicht auf ihre morphologischen Merkmale beschrieben.

In dem hier folgenden zweiten Teil meiner Untersuchungen ist die Mucorineen-Flora des Erdbodens vorwiegend mit Rücksicht auf ihre Biochemie behandelt worden.

Bei diesen Untersuchungen beabsichsigte ich besonders, eine erste Übersicht über das Verhalten dieser Pilze zu den verschiedenen Kohlen- und Stickstoffverbindungen zu geben, und zwar habe ich zu meinen Versuchen besonders solche Verbindungen herangezogen, von denen wir glauben können, dass sie auch im Erdboden den Pilzen zur Verfügung stehen, also z. B. Eiweissstoffe, Aminosäuren, Nitrate, Cellulose, Pektine, u. s. w.

Es mussten aber dabei die Versuche über einem ziemlich weiten Gebiete spannen und da mir dazu nur eine beschränkte Zeit übrig blieb, haben die Untersuchungen und ihre Resultate an mehreren Stellen einen mehr oder weniger vorläufigen Karakter bekommen. Dies gilt z. B. für die Versuche mit den Pektinverbindungen und den Mono- und Disacchariden.

Ich hoffe aber, durch die Veröffentligung meiner vorläufigen Resultate eine Übersicht gegeben zu haben, die bei weiteren Untersuchungen über die Biochemie der Mucorineen von Nutzen sein werden. Häufig wird ja auch erst wenn eine vorläufige Übersicht vorliegt, die Stellung weiterer Fragen ermöglicht.

Die Untersuchungen wurden im botanischen Laboratorium der Universität zu Kristiania ausgeführt. Ich erlaube mir hier dem Direktor des Laboratoriums, meinem hochgeehrten Herrn Lehrer, Professor Dr. H. H. Gran für die so liebenswürdig zu meiner Verfügung gestellten Hilfsmittel dieses Institutes meinen besten Dank auszusprechen.

Kristiania, Botanisches Laboratorium der Universität, 2. Dezember 1909.

Oscar Hagem.

Inhaltsverzeichnis.

Kap. I. Die Verbreitung der Mucorineen im Erdboden.

In einer Arbeit habe ich (1908) die erste orientierende Übersicht über die Mucorineen-Flora des Erbodens geliefert. Es wurden hier sowohl eine historische Übersicht der Frage als auch die Resultate eigner Untersuchungen gegeben. Im Ganzen führte ich 16 verschiedene Arten auf, die aus dem Erdboden mehr oder weniger häufig isoliert worden sind und in der Tat sind nun bei meinen weiteren Untersuchungen nach zahlreichen Analysen noch mehrere Arten gefunden, von denen ich 4—5 in einer anderen Arbeit beschreiben werde (Annales Mycologici — 1910).

In den letzten Jahren sind auch von LENDNER (1906, 1907, 1908) mehrere Arten, die aus dem Erdboden stammen, beschrieben worden. Es sind diese: *M. adventitius* OUD., *var. aurantiaca* LENDNER, *M. lausannensis* LENDNER, *M. genevensis* LENDNER, *M. Jansseni* LENDNER, *M. spinescens* LENDNER, *M. lamprosporus* LENDNER, *M. dimorphosporus* LENDNER, *Rhiz. nodosus* NAMYSL., *Abs. Lichtheimia* LENDNER (LUCET et CONSTATIN) (= *M. corymbifer* COHN).

Es sind also im ganzen durch LENDNERS und meine eignen Untersuchungen nicht weniger als 27 Arten aus dem Erdboden isoliert, hierzu kommen ausserdem zwei von OUDEMANS (1902) gefundene Arten und endlich auch die von HANSEN (1902) erwähnten obwohl nicht beschriebenen Arten, also zusammen 31 Mucorineen (die Mortierellaceen nicht mitgenommen), die aus Erdboden bekannt sind.

In dem folgenden Verzeichnis sind die Arten aus den Gattungen *Mucor* (incl. *Rhizopus*) und *Absidia* die wir bis jetzt aus dem Erdboden kennen aufgeführt worden. Nur die beschriebenen Arten sind mitgenommen, und nicht die nur mit nomina nuda bezeichneten (HANSEN 1902, BLAKESLEE 1904). Die mit einem Stern angeführten Arten habe ich bis jetzt im norwegischen Boden gefunden, die ohne einen solchen sind nur ausserhalb unseres Landes im Erdboden angetroffen (einige von ihnen in Norwegen doch aus der Luft isoliert).

Absidia cœrulea BAINIER — *Absidia cœrulea.* Bull. de la Soc. bot. de France. T. XXXVI.

* — *cylindrospora* HAGEM — Untersuch. über norwegische Mucorineen. I. Videnskabsselskabets Skrifter. Mat.-Nat. Klasse. No. 7. 1907. Kristiania.

* — *glauca* HAGEM — Untersuch. über norwegische Mucorineen. I. Videnskabsselskabets Skrifter. Mat.-Nat. Klasse. No. 7. 1907. Kristiania.

— *Lichtheimi* (LUCET et COSTATIN) LENDNER — Les Mucorinées de la Suisse. Materiaux pour la Flore Cryptogamique Suisse. Vol. III, fasc. 1.

* — *Orchidis* (VUILLEMIN) HAGEM — Untersuchungen über norwegische Mucorineen. I. Videnskabsselskabets Skrifter. Mat.-Nat. Klasse. No. 7. 1907. Kristiania.

— *spinosa* LENDNER — Les Mucorinées de la Suisse. Materiaux pour la Flore Cryptogamique Suisse. Vol. III, fasc. 1.

**Mucor Christianiensis* HAGEM — Neue Untersuchungen über norwegische Mucorineen. Annales Mycologici, 1910.

— *circinelloïdes* v. TIEGH. — Nouvelles recherches sur les Mucorinées. Ann. des sciences nat., Bot., Sér. 6, T. I, 1875.

* — *corticolus* HAGEM — Neue Untersuchungen über norwegische Mucorineen. Annales Mycologici, 1910.

— *dimorphosporus* LENDNER — Les Mucorinées de la Suisse. Materiaux pour la Flore Cryptogamique Suisse. Vol. III, fasc. 1.

* — *dispersus* HAGEM — Neue Untersuchungen über norwegische Mucorineen. Annales Mycologici, 1910.

* — *flavus* BAINIER — Sur quelques espèces de Mucorinées nouvelles ou peu connues. Bull. Soc. mycol. de France. T. XIX, 1903.

* — *genevensis* LENDNER — Les Mucorinées de la Suisse. Materiaux pour la Flore Cryptogamique Suisse. Vol. III, fasc. 1.

— *geophilus* OUDEMANS — Prodrome d'une Flore mycol. du Spanderwoud. Arch. Néerlandaises des Sc. ex et nat., 2e Série, vol. VII, 1902.

* — *griseo-cyanus* HAGEM — Untersuchungen über norwegische Mucorineen. I. Videnskabsselskabets Skrifter. Mat.-Nat. Klasse. No. 7. 1907. Kristiania.

* — *hiemalis* WEHMER — Der *Mucor* der Hanfrötte, *Mucor hiemalis* n. sp. Annales mycologici. T. I. 1903.

— *Jansseni* LENDNER — Les Mucorinées de la Suisse. Materiaux pour la Flore Cryptogamique Suisse. Vol. III, fasc. 1.

Mucor lamprosporus LENDNER — Les Mucorinées de la Suisse. Materiaux pour la Flore Cryptogamique Suisse. Vol. III, fasc. I.

* — *Mucedo* (LINNÉ) BREFELD — Bot. Untersuch. über Schimmelpilze. H. 1, Zygomyceten, 1872.

* — *nodosus* (NAMYSLOWSKI) HAGEM — NAMYSLOWSKI: *Rhizopus nigricans* et les conditions de la formation de ses zygospores. Bull. intern. de l'Académie des sciences de Cracovie. Class. math. et nat. No. 7. Juillet 1906. HAGEM: Neue Untersuchungen über norwegische Mucorineen. Annales Mycologici, 1910.

* — *racemosus* FRESENIUS — Beiträge zur Mycologie, 1850.

* — *Ramannianus* A. MØLLER — Untersuchungen über ein- und zweijährige Kiefern im markischen Sandboden. Zeitschr. f. Forst- u. Jagdwesen, H. 5—6, Jahrg. 1903.

* — *saturninus* HAGEM — Neue Untersuchungen über norwegische Mucorineen. Annales Mycologici, 1910.

* — *silvaticus* HAGEM — Untersuchungen über norwegische Mucorineen. I. Videnskabsselskabets Skrifter. Mat.-Nat. Klasse. No. 7. 1907. Kristiania.

* — *sphaerosporus* HAGEM — Untersuchungen über norwegische Mucorineen. I. Videnskabsselskabets Skrifter. Mat.-Nat. Klasse. No. 7. 1907. Kristiania.

* — *spinosus* v. TIEGH. — Troisième mémoire sur les Mucorinées. Ann. des Sciences nat., Bot., Sér. 6, T. IV, 1875.

* — *stolonifer* = *Rhizopus nigricans* EHRENBERG — Nova Acta Acad. Leop., XI.

* — *strictus* HAGEM — Untersuchungen über norwegische Mucorineen. I. Videnskabsselskabets Skrifter. Mat.-Nat. Klasse. No. 7. 1907. Kristiania.

* — *Zygorhynchus Moelleri* P. VUILLEMIN. — Bull. Soc. mycol. de France, T. XIX, 1903.

Die meisten von mir untersuchten Mucorineen sind aus dem Erdboden isoliert, und da in einem folgenden Kapitel diese Mucorineenflora näher behandelt wird, darf hier einziges über die bei den Erdboden-Analysen verwendeten Metoden Platz finden.

Um den Gehalt einer Erdprobe an Mucorineenkeimen zu untersuchen, habe ich mich immer einer Verdünnung in sterilisiertem Wasser bedient.

Die Erdproben sind in sterilen Reagensgläsern oder Kolben eingesammelt worden, dann nach kurzem Trocknen z. B. 5 oder 10 Gr. in sterilem Wasser verteilt und durch mehrstündiges Stehen und häufiges Umschütteln ist dafür gesorgt, dass die einzelnen Partikeln von einander losgerissen werden. Mit gebauter Erde gelingt dies leicht, bei der stark humösen an Pflanzenmaterial reichen Walderde aber wird es häufig notwendig die Erdprobe schnell mit einem sterilen Messer zu zerkleinern. Die Gefahr für eine grössere Verunreinigung ist ja hierbei klein, wenn wir bedenken, dass sich in einem Gram Erde viele tausend Pilzkeime finden. Von dem ersten Kolben mit dem Erdmaterial wurde nun mittels steriler Pipetten gewöhnlich 5 Cm^3 ausgenommen und in einem zweiten Kolben mit sterilem Wasser verteilt. Aus diesem wurde dann wieder 5 Cm^3 in einen dritten Kolben getan und hier tüchtig umgeschüttelt. Der Verdünnungsprocess wurde immer so ausgeführt, dass in dem zweiten Kolben jeder Cubikcentimeter Wasser die Keime von 10 Mgr. Erde, in dem dritten Kolben dagegen nur von 1 Mgr. Erde enthielt. Um die Art der Keime untersuchen zu können habe ich genau 1 Cm^3 von dem Wasser im dritten Kolben, also 1 Mgr. Erde entsprechend, in Petrischalen mit fester Würzegelatine gebracht und hier das Wasser durch Schütteln auf die ganze Oberfläche des Substrates verteilt. Mit einiger Übung gelingt dies sehr gut, und nach einigen Stunden hat die Gelatine alles Wasser absorbiert, so dass die Keime gut verteilt auf die Oberfläche liegen. Die Verwendung von Gelatine ist bei diesen Versuchen immer dem Agar vorzuziehen, da bei dem letzteren das Wasser nicht absorbiert wird, sondern vielmehr Wasser ausgeschieden, was die ganze Analyse zerstört.

Bei den meisten Versuchen habe ich die Würzegelatine durch Zusatz von 0,1 % Zitronensäure angesäuert und hierdurch die Entwickelung der nicht zu untersuchenden Bakterien stark gehemmt, während zugleich die Mucorineen in ihrem Wachstum befördert wurden.

Auf diesen Platten keimen nun die Mucorineen leicht und entwickeln sich vor den meisten anderen Pilzen. Die oben erwähnte Verdünnung, wobei in jeder Schale Material von 1 Mgr. Erde kam, gab meist eine befriedigende »Konzentration« von Mucorineen, so dass die Kolonien sowohl gezählt wie bestimmt werden konnten. Wenn der Gehalt an Pilzkeimen ziemlich gering war, wurde aus dem zweiten Kolben 1 Cm^3 Wasser, also 10 Mgr. Erde entsprechend, auf die Gelatine verteilt. Nur einige langsam wachsende Arten wie *Mucor Ramannianus* und ausserdem die kleinen Mortierellaen wie *Mort. Isabellina, humicola* u. and. sind hierbei leicht zu übersehen, da sie gewöhnlich von den grossen Arten wie besonders *Absidia*-Arten leicht überwuchert werden.

1. Der kultivierte Ackerboden.

Der Pilzgehalt der verschiedenen kultivierten Erden ist ein relativ niedriger. In dem wenig humösen Boden des gut durcharbeiteten Ackerlandes und des Gartens spielen vielmehr die Bakterien eine bedeutende Rolle und kommen hier häufig in grossen Mengen vor, während die Pilze gewöhnlich ganz in den Hintergrund treten. Auch im kultivierten Erdboden sind aber die Mucorineen immer vorhanden und zwar häufig als die am meisten dominierenden Arten, während sie in anderen Fällen von den gewöhnlichen *Penicillium-* und *Cladosporium-*Arten überstiegen werden.

Leider sind meine Untersuchungen über den Pilzgehalt des kultivierten Bodens relativ wenig umfassend geworden, teils wegen der ausserordentlich häufigen gelatinlösenden Bakterien, die viele Analysen ganz zerstört haben, teils weil mir die Untersuchung des humösen Waldbodens mit seinen zahlreichen Arten viel interessanter gewesen ist. Von meinen Analysen des Pilzgehaltes im kultivierten Boden werde ich hier jedoch einige anführen.

Die Untersuchung fand statt:	Art und Beschaffenheit des Bodens	Aus der Probe isolierte Mucorineen
	Erde auf Kartoffeln	*M. racemosus*
	Erde auf Kartoffeln	*M. racemosus*
		M. hiemalis
August 1906	Gartenerde. Kristiania	*M. Christianiensis*
		M. hiemalis
		M. spinosus
		M. nodosus
August 1906	Gartenerde. Botanischer Garten, Kristiania	*M. Christianiensis*
		M. nodosus
September 1906	Ackererde. Vestre Aker bei Kristiania	*M. griseo-cyanus*
		M. nodosus
April 1907	Ackererde. Vestre Aker bei Kristiania	*Absidia cylindrospora*
Oktober 1908	Erde aus einem Kartoffelacker, in einer Tiefe von 10 cm. zwischen den Kartoffeln genommen. Vestre Aker bei Kristiania	*M. sphaerosporus* 250 Sporen pr. Gram Erde
		M. stolonifer 350 —»—
		M. nodosus 250 —»—
		Abs. cylindrospora 250 —»—
		Zyg. Moelleri 250 —»—
Oktober 1908	Erde aus einem Kartoffelacker. Finnerud, Nordmarken bei Kristiania	*M. spinosus* 150 Sporen pr. Gram Erde
		Mucor sp. (Nr. 666, a) 3000 —»—
		M. stolonifer 400 —»—

Es giebt diese kleine Tabelle allenfalls eine Übersicht über den Mucorineen-Gehalt des Ackerbodens. Ausserdem sind aber mehrere andere Arten isoliert worden, die in den oben angeführten Analysen nicht mitgekommen sind. Im ganzen sind aus kultiviertem Boden (Ackerboden, Gartenerde u. s. w.) folgende Arten isoliert:

Mucor Mucedo
— *sphaerosporus*
— *racemosus*
— *Christianiensis*
— *hiemalis*
— *griseo-cyanus*
— *spinosus*
— *stolonifer*
— *nodosus*
Absidia Orchidis
— *cylindrospora*
Zygorhynchus Moelleri.

Von diesen Arten sind besonders die drei, *M. racemosus, M. hiemalis* und *M. nodosus* sehr häufig, und gerade der letzte, *M. nodosus,* karakterisiert, obwohl er nicht immer zugegen ist, durch sein häufiges und ausschliessliches Auftreten im kultivierten Boden diese Gesellschaft ganz gut. Von den übrigen Arten kommt *M. Mucedo* meist in Erdboden, der mit Mist gedüngt wird, vor, während *M. spinosus, M. stolonifer* und *M. griseo-cyanus* nicht von derartigen Verhältnissen abhängig sind. *M. sphaerosporus* und *M. Christianiensis* endlich sind sehr selten, im ganzen jeder nur dreimal isoliert, aber auch diese sind eben wie *M. nodosus* ausschliesslich im kultivierten Boden gefunden.

2. Der Boden der Nadelwälder.

Die oberen, stark humösen Schichten des Erdbodens unserer Nadelwälder sind durch ihren grossen Reichtum an Pilzen ausgezeichnet, und zwar tritt hier eine Reihe von sehr schönen und interessanten Mucorineen hervor, besonders von den Gattungen *Mucor, Absidia* und *Mortierella.* Mit Ausnahme der Mortierellaceen habe ich die Mucorineen-Flora dieses Bodens durch viele Analysen ziemlich genau studiert und die einzelnen Arten in ihrem Vorkommen etwas näher verfolgt.

Eine Übersicht über diese reiche Mucorineen-Vegetation giebt die folgende Tabelle, wo eine Reihe von Analysen, teils von dem Boden der Fichtenwälder, teils aus den Kiefernwäldern zusammengestellt ist.

Die Untersuchung fand statt:	Art und Beschaffenheit des Bodens	Aus der Probe isolierte Mucorineen
April 1906	Kiefernwald. Obere Schichten des Bodens, meist aus Kiefernadeln bestehend. Bygdö bei Kristiania	*M. hiemalis* *M. spinosus* *Mucor sp.*
—»—	Kiefernwald. Stark humöse tiefere Schichten an derselben Lokalität wie vorige Probe	*M. hiemalis* *M. spinosus* *Abs. cylindrospora*
—»—	Kiefernwald. Obere Schichten des Bodens, meist aus Kiefernadeln bestehend. Nötterö bei Tönsberg	*M. Ramannianus* *Abs. Orchidis*
—»—	Kiefernwald. Obere Schichten des Bodens, ausschliesslich aus verwesenden Kiefernadeln bestehend. Blankvand, Nordmarken bei Kristiania	*M. Ramannianus* *M. hiemalis*
Mai 1907	Kiefernwald. Obere Schichten des Bodens, aus Kiefernadeln und verwesenden Gramineenhalmen bestehend. Aarvold, Ø. Aker bei Kristiania	*M. saturninus* *M. racemosus* *M. hiemalis* *Mucor sp.* (wahrsch. *M. strictus*) *Absidia sp.* *Zyg. Moelleri*
Juli 1907	Kiefernwald. Obere Schichten aus Kiefernadeln und Vaccinium-Blättern bestehend. V. Aker bei Kristiania	*M. Ramannianus* 9000 Sporen pr. Gram Erde
April 1906	Fichtenwald. Obere, stark humöse und saure Schichten des Bodens, aus Vacciniumwurzeln, verwesenden Zweigen und Fichtennadeln bestehend. Svartorsæter, Nordmarken bei Kristiania	*M. strictus* *M. Ramannianus* *M. hiemalis* *Mucor sp.*
August 1906	Fichtenwald. Verwesende Fichtennadeln. Frognersæteren bei Kristiania	*M. hiemalis*
—»—	Fichtenwald. Obere humöse Schichten des Bodens. Langlidalen bei Kristiania	*M. Ramannianus* *M. flavus* *M. hiemalis* *M. silvaticus*
—»—	Fichtenwald. Verwesender Fichtenstrunk. Mærradalen bei Kristiania	*M. Ramannianus* *M. hiemalis* *Absidia sp.*

Die Untersuchung fand statt:	Art und Beschaffenheit des Bodens	Aus der Probe isolierte Mucorineen
September 1906	Fichtenwald. Stark verwesender Fichtenstamm. Tryvand, Nordmarken bei Kristiania	*M. strictus* *M. hiemalis*
—»—	Fichtenwald. Verfaulende Pilze. Vettakollen bei Kristiania	*M. silvaticus* *Mortierella sp.*
September 1907	Fichtenwald auf Sandboden. Obere Schichten des Bodens, meist aus Fichtennadeln bestehend. Möllerstad bei Dal Eisenbahnstation, Romerike	*M. Ramannianus* 50 000 Sporen pr. Gram Erde *M. strictus* *Mucor sp.* (Nr. 590, f.) 20 000 Sporen pr. Gram Erde *M. hiemalis* *M. silvaticus.* Unbestimmter Pilz mit 2 500 000 Sporen pr. Gram Erde
Juli 1908	Fichtenwald. Obere humöse Schichten des Bodens, aus Moos und verwesenden Fichtennadeln bestehend. Bei Hauersæter, Romerike	*M. Ramannianus* (dominierend, äusserst zahlreich) *M. silvaticus* *M. genevensis* *Mortierella Isabellina*
—»—	Fichtenwald. Obere humöse Schichten des Bodens. Ø. Bærum bei Kristiania	*M. Ramannianus* *Abs. glauca* *Abs. cylindrospora* *Mort. Isabellina*

Wie aus den obigen Analysen hervorgeht, sind die Mucorineen im Waldboden äusserst häufig und bilden einen sehr grossen und interessanten Teil der Pilzvegetation. Die am häufigsten vorkommende Art ist der kleine *M. Ramannianus*, nach welchem ich (1907) die Mucorineen-Gesellschaft der Nadelwälder die *Mucor Ramannianus*-Gesellschaft genannt habe. Je nachdem nun der Wald aus Kiefer oder Fichte besteht, ändert sich auch diese Gesellschaft in ihrer Zusammensetzung. Der *M. Ramannianus* ist immer vorhanden, er wird aber in dem Kieferwalde besonders von den *Absidia*-Arten wie *Abs. Orchidis* und *Abs. cylindrospora* oder auch *Abs. glauca* begleitet, während dagegen im Fichtenwalde *Mucor*-Arten wie *M. strictus* und vor allem der karakteristische *M. silvaticus* die häufigsten Mitglieder der Gesellschaft sind.

Im ganzen sind während meiner Untersuchungen folgende Mucorineen aus dem Boden unserer Nadelwälder isoliert worden.

	Zahl der Isolierungen
Mucor strictus	16
— *Ramannianus*	45
— *saturninus*	1
— *flavus*	12
— *racemosus*	5
— *hiemalis*	50
— *genevensis*	1
— *spinosus*	9
— *silvaticus*	28
— *corticolus*	3
— *stolonifer*	3
Absidia Orchidis	15
— *glauca*	9
— *cylindrospora*	11
Zygorhynchus Moelleri	2

3. Verschiedene unbebaute Erden (ausserhalb der Nadelwälder).

Es sind auch von unbebauter Erde von verschiedenen Stellen ausserhalb der Nadelwälder recht zahlreiche Analysen ausgeführt und dadurch eine Reihe von Mucorineen angetroffen, teils solche die im Waldboden oder kultiviertem Boden vorkommen, teils aber auch seltnere hier nicht isolierte Arten. Ich gebe hier einige der Analysen:

Die Untersuchung fand statt:	Art und Beschaffenheit der Bodens	Aus der Probe isolierte Mucorineen
März 1906	Spärliche, wenig tiefe Erde eines Felsenabhanges mit Vegetation von Gramineen. Smedstad, V. Aker bei Kristiania	*M. hiemalis* *M. griseo-cyanus* *Zyg. Moelleri*
—»—	Erde unter Gramineenwurzeln. Hof, V. Aker bei Kristiania	*M. hiemalis* *Abs. glauca* *Zyg. Moelleri*
—»—	Spärliche, wenig tiefe Erde eines kleinen Felsenabhanges. Vegetation hauptsächlich Gramineen, *Potentilla argentea* und *Sedum*-Arten. Frogner bei Kristiania	*M. Mucedo* *M. racemosus* *M. hiemalis* *Absidia sp.*
April 1906	Erde unter Gramineenwurzeln auf Schieferfelsen. Bygdö bei Kristiania	*M. hiemalis* *Abs. glauca* *Zyg. Moelleri*

Die Untersuchung fand statt:	Art und Beschaffenheit des Bodens	Aus der Probe isolierte Mucorineen
April 1906	Erde unter Gramineenwurzeln auf Schieferfelsen. Frogner bei Kristiania	*Abs. cylindrospora*
—»—	Verwesende Blätter von *Corylus Avellana*. Frogner bei Kristiania	*M. hiemalis* *M. spinosus* *Zyg. Moelleri*
—»—	Schwarzer, stark humöser und saurer Erdboden. Nordmarken bei Kristiania	*M. Ramannianus*
—»—	Spärliche, wenig tiefe Erde eines Felsenabhanges am Rande eines Kiefernwaldes. Vegetation ausschliesslich *Cladonia* und *Polytrichum* sp. Nötterö bei Tönsberg[1]	*M. Ramannianus* (äusserst zahlreich)
Juli 1906	Sphagnum an dem Ufer eines Waldsees. Tryvand bei Kristiania	*M. Ramannianus* *M. hiemalis* *Mucor sp.*
September 1906	Erde zwischen *Empetrum nigrum* auf Sandboden wachsend. Kirköen (Hvalöerne) bei Fredriksstad	*M. racemosus*
April 1907	Erde mit verwesenden Blättern von *Tilia* und *Corylus*. Mærradalen bei Kristiania	*M. strictus* *M. hiemalis* *Mucor sp.* *Abs. cylindrospora*
Juli 1907	Spärliche Erde unter einer Vegetationsdecke von *Cladonia* sp. »Hardangervidda«, 1200 M. ü. d. M.	*M. Ramannianus* (äusserst zahlreich)
Juni 1908	Erde unter Wurzeln von *Polypodium vulgare* an einem Felsenabhang. Vasser pr. Tönsberg	*M. hiemalis* *Abs. Orchidis*
—»—	Erde zwischen Wurzeln von *Juniperus communis* an einem Felsenabhang. Vasser pr. Tönsberg	*M. Ramannianus* 21 000 Sporen pr. Gram Erde *M. dispersus* *Abs. Orchidis* 1700 Sporen pr. Gram Erde *Abs. cylindrospora* 2000 Sporen pr. Gram Erde *Mortierella Isabellina* 3300 Sporen pr. Gram Erde
August 1908	Erde zwischen Wurzeln von *Empetrum nigrum*. Eidet, Langö, Vesteraalen	*Mortierella sp.*

[1] Die Probe wurde mir von Amanuensis Thekla Resvoll gütigst überlassen.

Die Untersuchung fand statt:	Art und Beschaffenheit des Bodens	Aus der Probe isolierte Mucorineen
August 1908	Erde zwischen Wurzeln von *Silene acaulis* (ausserdem *Saxifraga oppositifolia, Alchemilla alpina*). Eidet, Langö, Vesteraalen[1]	*M. Ramannianus* *Mortierella sp.*

Aus den oben angeführten Analysen, an denen sich noch mehrere hier nicht mitgenommene reihen, geht ohne weiteres hervor, dass die Mucorineen im Erdboden in zahlreichen Arten weit verbreitet sind.

Es stellt sich nun vor allem die Frage, ob sie hier nur zufällig vorkommen, als Sporen aus der Luft z. B. eingeschleppt sind, oder ob sie vielleicht im Erdboden zu Hause sind, d. h. hier ihre natürliche Brutstellen haben.

Nach meinen Untersuchungen bin ich nun davon überzeugt, dass das letzte der Fall ist.

Betrachten wir nämlich die Verbreitung der einzelnen von mir gefundenen Arten, so sind nicht weniger als 16 ausschliesslich aus dem Erdboden bekannt, und zwar sind davon die 12 hier sehr häufig vorkommend. Es sind die von mir isolierten Arten die folgenden:

Mucor strictus
— *Ramannianus*
— *flavus*
— *Christianiensis*
— *sphaerosporus*
— *saturninus*
— *hiemalis*
— *genevensis*
— *dispersus*
— *griseo-cyanus*
— *silvaticus*
— *nodosus*
Absidia Orchidis
— *glauca*
— *cylindrospora*
Zyg. Moelleri.

Es wird vielleicht von Interesse sein, einige der am meisten karakteristischen von diesen Arten etwas näher in ihrer Verbreitung zu verfolgen.

[1] Die zwei letzten Proben wurden von stud. min. Th. Vogt eingesammelt und mir freundlichst überlassen.

Mucor strictus, der obschon er mit den Kulturbedingungen sehr variirt, doch immer leicht erkennbar ist, ist bis jetzt nur aus der Umgegend Kristianias bekannt. Hier habe ich ihn aber aus 16 verschiedenen Erdproben isoliert, und er ist überhaupt als ein für unsere Nadelwälder, besonders Fichtenwälder, sehr karakteristischer Pilz anzusehen. Im Erdboden der Fichtenwälder ist er besonders häufig aus den oberen, meist aus verwesenden Fichtennadeln bestehenden Schichten zu isolieren, doch habe ich ihn auch einmal in einem verwesenden Fichtenstrunk als einzigen Pilz gefunden und zwar hier in ungeheuren Mengen (20 000—30 000 Sporen pr. Gram verwesender Holzmasse). Durch weitere Untersuchungen wird sich wohl diese karakteristische Art auch ausserhalb Norwegen auf weiteren Gebieten finden lassen.

Mucor Ramannianus, den weitaus häufigsten *Mucor* der Nadelwälder, habe ich in Norwegen in beinahe 50 Erdproben gefunden und davon ist der ganz überwiegende Teil aus den Boden der Fichten- und Kiefernwälder genommen. Ausserdem ist er aber auch an anderen Lokalitäten gefunden und er gehört z. B. zu den am meisten karakteristischen Mucorineen in dem sauren, humusreichen Boden der West-Norwegischen *Calluna*-Heide. Auch in unseren Hochgebirgen habe ich *M. Ramannianus* angetroffen und in einigen Erdproben, die auf »Hardangervidda« in einer Höhe von 1200 Meter unter einer Vegetationsdecke ausschliesslich von *Cladonia*-Arten bestehend in Juli genommen wurden, war dieser kleine *Mucor* in sehr grossen Mengen vorhanden. Ausserhalb Norwegen ist dieser Pilz von Deutschland (A. Möller — 1903) bekannt, und auch in England ist er wahrscheinlich verbreitet, da ich ihn aus von England stammenden Sphagnum gezüchtet habe, — eine also im ganzen ziemlich weite Verbreitung.

Mucor flavus ist ebenso weit verbreitet. In Norwegen habe ich ihn in den Nadelwäldern der Umgebung Kristianias häufig isolieren können. Er kommt hier vorwiegend in den oberen humusreichen Schichten des Fichtenwaldbodens vor und ist hier auch zuweilen an verfaulenden Hutpilzen beobachtet. In Europa ist er sonst durch Bainier (1903) und Lendner (1908) aus Frankreich und der Schweiz bekannt, wo er ebenso im Erdboden oder an verfaulenden Agaricineen angetroffen wird.

Mucor Christianiensis gehört zu den seltneren Arten. Er wurde aus Gartenerde im botanischen Garten zu Kristiania isoliert.

Mucor sphaerosporus ist sehr selten und bisher von mir nur in drei Erdproben gefunden, die sämtliche aus kultiviertem Boden stammen. Zum ersten Mal wurde er in Norwegen von Prof. H. H. Gran an Kiefernmykorrhizen angetroffen.

Mucor saturninus und *Mucor dispersus* sind noch seltnere Arten, der estere nur zweimal, der letztere ein einziges Mal im Erdboden im südlichen Norwegen gefunden.

Mucor hiemalis dagegen ist einer der gewöhnlichsten Erdboden-Mucorineen, und zwar kommt dieser überall vor, in bebauter Erde, in Waldboden, in Wiesenboden, an faulenden Pilzen u. s. w. Ausserhalb Norwegen ist dieser Pilz auch von Deutschland (Behrens — 1902, Wehmer — 1903) und der Schweiz (Lendner — 1908 b) bekannt.

Mucor genevensis, der durch (Lendner — 1908 a, 1908 b) von der Schweiz bekannt geworden ist, habe ich in Norwegen nur ein einziges Mal angetroffen und zwar in einer Erdprobe, die von den oberen, humusreichen Schichten eines Fichtenwaldbodens (bei Hauersæter im Ullensaker) genommen war.

Mucor griseo-cyanus ist vorwiegend, obwohl im ganzen nicht häufig, aus kultivierter Erde isoliert. Durch Lendners Untersuchungen scheint dieser Pilz in der Schweiz relativ häufiger zu sein.

Mucor silvaticus ist einer der am meisten karakteristischen Mucorineen in unseren Fichtenwäldern und an solchen Lokalitäten in der Umgegend Kristianias durch mehr als 20 Isolierungen bekannt. In der Schweiz ist er auch in Fichtenwäldern von Lendner (1908 b) angetroffen.

Mucor nodosus ist für die bebaute Ackererde sehr typisch und in der Umgegend von Kristiania recht häufig angetroffen. Er zeichnet sich merkwürdiger Weise durch seine im Vergleich mit anderen Erdboden-Mucorineen sehr hoch liegenden Temperaturgrenzen aus. Er wurde zuerst vor einigen Jahren (1906) von Namyslowski beschrieben.

Absidia Orchidis und *Absidia glauca* sind beide typisch erdbewohnende Arten. Die erstere, die von Vuillemin (1903) zum erstenmal an einer Orchideen-Wurzel gefunden wurde, ist wahrscheinlich in Norwegen die häufigst vorkommende Art, obwohl *Absidia glauca* auch durch recht viele Isolierungen bekannt ist. Beide Arten sind von Lendner (1908) aus dem Erdboden in der Schweiz gezüchtet.

Absidia cylindrospora Hagem ist auch im Erdboden sehr häufig. Sie zeichnet sich durch ihr häufiges Vorkommen auch in wenig humusreicher Erde aus und ist mehrmals von reinem Schutt- oder Sandboden isoliert worden.

Zygorhynchus Moelleri endlich ist von allen Erdboden-Mucorineen der, der die weiteste geographische Verbreitung zeigt, indem er bisjetzt aus Amerika (Blakeslee — 1904), der Schweiz (Lendner — 1908 b), Deutschland (A. Möller — 1903), Österreich (Raciborski-Wiśniewski — 1908) und Norwegen bekannt ist. Merkwürdiger Weise habe ich diesen Pilz

relativ sehr selten im Boden unserer Nadelwäder angetroffen, dagegen scheint er in Laubwäldern und besonders in der wenig humösen, spärlichen Erde an den kleinen Felsenabhängen im Kristianiatal weit verbreitet zu sein.

An diese ausschliesslich aus dem Erdboden isolierten Mucorineen reihen sich nun einige der gewöhnlichsten und am besten bekannten *Mucor*-Arten, die schon in zahlreichen Laboratorien Europas und Amerikas in Kultur gehalten worden sind, gewöhnlich wohl durch spontane Infektion aus der Luft isoliert, die ich aber bei meinen Untersuchungen auch sehr häufig im Erdboden angetroffen habe. Es sind diese die vier Arten:

Mucor Mucedo
— *racemosus*
— *spinosus*
— *stolonifer.*

Eine Reihe von den oben erwähnten Mucorineen sind also aus weit entfernten Ländern bekannt, und zwar sind sie hier überall aus dem Erdboden isoliert. Die Annahme, dass diese Mucorineen im Erdboden auch ihre natürlichen Brutstellen haben, wird also hierdurch in erheblicher Weise gestützt.

Es wird aber die Gültigkeit dieser Annahme auch von einer Reihe von mir ausgeführten Analysen bewiesen. Wenn wir nämlich annehmen, dass diese verschiedenen Mucorineen wircklich im Erdboden zu Hause sind und hier einen Teil der Pilzflora ausmachen, dann müssen wir auch aus mehreren in physikalisch-chemischen Eigenschaften gleichwertigen, aber an entfernten Stellen eingesammelten Erdproben, dieselbe Pilzflora züchten können. Nun ist es natürlich keine leichte Sache, beim Auswählen dieser Proben die Forderung an Gleichwertigkeit in befriedigender Weise zu erfüllen. Annähernd lässt sich jedoch in unseren Nadelwäldern eine solche Probenentnahme realisieren, und besonders habe ich von dem sauren, humösen Boden der Fichtenwälder in der Umgegend Kristianias recht zahlreiche Analysen ausgeführt, und in der überwiegenden Zahl der Proben habe ich dann die *Mucor-Ramannianus*-Gesellschaft in ihrer für Fichtenwälder karakteristischen Modifikation, also mit *M. Ramannianus*, *M. silvaticus*, *M. strictus* und *M. hiemalis* als dominierende Arten, wiedergefunden (Hagem — 1907).

Besonders klar ist aber diese Einförmigkeit und Konstanz der Mucorineen-Flora bei einigen Analysen der West-Norwegischen *Calluna*-Heide hervorgetreten. Die phanerogame Vegetation dieser Heide besteht hauptsächlich aus *Calluna vulgaris*, *Erica tetralix* und sparsam eingemengt *Polygala*, *Hieracium*, *Narthesium ossifragum*, *Carex*-Arten und *Gramineen.*

Der Erdboden ist sehr humusreich und häufig von ziehmlich stark saurer Reaktion. Auf dieser Heide, die auf grossen Strecken südlich von Bergen zwischen den Eisenbahnstationen Kallandseid, Söfteland und Ulven ausgebildet ist, wurden an mehreren entfernten Stellen Proben (im ganzen 5) ausgenommen und auf ihren Pilzgehalt analysiert. Die folgende kleine Tabelle zeigt das Resultat von vier Proben:

Die Untersuchung fand statt:	Art und Beschaffenheit des Bodens	Aus der Probe isolierte Mucorineen		
Juli 1907	Saure, humusreiche Erde unter *Calluna*-Wurzeln. — *Calluna*-Heide bei Söfteland in der Nähe von Bergen	*Mucor Ramannianus*	1500	Sporen pr. Gram Erde
		Absidia Orchidis	7500	—»—
		Mortierella sp.	9500	—»—
		Penicillium sp.	3700	—»—
		2 andere Pilze	8000	—»—
Juni 1907	Saure, humusreiche Erde von der *Calluna*-Heide bei Ulven südlich von Bergen	*Mucor Ramannianus*	800	Sporen pr. Gram Erde
		Absidia Orchidis	600	—»—
		Penicillium sp.	13 000	—»—
		Andere Pilze	1000	—»—
Juni 1907	Humusreiche Erde aus *Calluna*-Heide bei Kallandseid südlich von Bergen	*Mucor Ramannianus*	1100	Sporen pr. Gram Erde
		Absidia Orchidis	850	—»—
		Mortierella sp.	200	—»—
		Mortierella sp.	300	—»—
		Andere Pilze	1400	—»—
Juli 1907	Humusreiche Erde unter *Calluna*-Wurzeln. — *Calluna*-Heide bei Söfteland südlich von Bergen	*Mucor Ramannianus*	1500	Sporen pr. Gram Erde
		Absidia Orchidis	900	—»—
		Zygorhynchus Moelleri	50	—»—
		Penicillium sp.	11 000	—»—

Es sind also die zwei Mucorineen, *Mucor Ramannianus* und *Absidia Orchidis*, durch ihr stetiges Auftreten besonders für die hier untersuchte *Calluna*-Heide als karakteristisch anzusehen, und zwar beweist auch das konstante Auftreten dieser zwei Arten in mehreren gleichwertigen Proben ohne Zweifel, dass sie allenfalls in diesem Erdboden eben zu Hause sind und hier eine ihrer natürlichen Brutstellen haben.

4. Die Erdboden-Mucorineen und ihr Verhältnis zur Mykorrhizafrage.

Ehe ich zur Besprechung der ausgeführten biochemischen Versuchen übergehe, mögen hier einige Bemerkungen über die erdbewohnenden Mucorineen und ihr Verhältnis zu den Mykorrhizabildungen unserer Waldbäume Platz finden. Es war mir leider nicht Gelegenheit gegeben,

diese Frage in entscheidender Weise zu untersuchen, und es werden daher hier nur einzelne, mehr oder weniger gelegentlich gemachte Beobachtungen gegeben.

In meiner Arbeit (1907) habe ich mehrmals angeführt, dass die eine oder andere Art »aus Kiefernmykorrhizen isoliert« sei. Damit ist nun natürlich nicht gemeint, dass die betreffende Art mit dem Mykorrhizapilze der Kiefer identisch sei. Sowohl die von Professor Gran bei seinen Untersuchungen über die Mykorrhizafrage wie auch die später von mir isolierten Arten haben sich nur auf auswendig sterilisierten Wurzeln, die auf Agar gebracht sind, entwickelt. Es sind nun die Pilze, die sich in solchen Fällen entwickeln, gar nicht ohne weiteres als Mykorrhizapilze anzusehen. Vielmehr bin ich davon überzeugt, dass sich die Frage nach der mykorrhizabildenden Pilzen nur durch experimentelles Hervorrufen des Phänomens zu lösen sei. Man kann die im Erdboden unter den Wurzeln lebenden Pilze studieren, man kann die Pilzflora der sterilisierten Wurzeln studieren, oder wie man wünscht, erst aber durch Kultur der betreffenden Pflanze in sterilisiertem Erdboden, der mit Reinkulturen des zu prüfenden Pilzes infiziert wird, darf eine Entscheidung der Frage erwartet werden. Wird dabei durch Infektion eines bestimmten Pilzes im Kulturtopfe die Mykorrhizabildungen hervorgerufen, dann ist es auch wahrscheinlich, dass derselbe Pilz unter natürlichen Verhältnissen dieselben Bildungen hervorrufen kann. Diese experimentellen Kulturversuche mit denen von mir isolierten Mucorineen habe ich leider wegen Mangel an Zeit nicht vornehmen können.

Es sind aber mehrere Analysen ausgeführt worden, um die im Erdboden unter den mykorrhizabefallenden Wurzeln lebenden Mucorineen näher kennen zu lernen. Wie im Voraus zu erwarten war, haben sich hierbei eben die im Waldboden häufigsten Mucorineen finden lassen. Besonders zwischen Kiefernwurzeln sind die häufigsten Arten:

M. hiemalis
M. Ramannianus.

Bei einer anderen Versuchsreihe sind mykorrhizabefallende Wurzeln besonders von Kiefer aber auch von Fichte mehrere Tage in fliessendem Wasser abgespült worden und darauf auf Nähragar in Petrischalen gebracht. Auch hier haben sich nun die gewöhnlichen Erdboden-Mucorineen entwickelt, wie die folgende Tabelle zeigt:

Die Untersuchung fand statt:	Art und Beschaffenheit des Bodens	Aus der Probe isolierte Mucorineen
Oktober 1906	Gabelige Kiefernmykorrhiza (*P. silvestris*) aus *Sphagnum*-Moor. Vettakollen bei Kristiania.	(*Aspergillus* sp. (Nr. 203, a))
November 1906	Kiefernmykorrhiza (*P. montana* in einem Garten kultiviert). Slemdal bei Kristiania.	*Mucor hiemalis*
— » —	Kiefernmykorrhiza (*P. silvestris* in einem Garten kultiviert). Slemdal bei Kristiania.	*Absidia Orchidis*
Mai 1907	Fichtenmykorrhiza (*Picea excelsa*) aus Waldboden. V. Aker bei Kristiania.	*M. Ramannianus* *M. silvaticus* (*Penicillium* sp.)
— » —	Kiefernmykorrhiza aus Waldboden. Ø. Bærum bei Kristiania.	*M. hiemalis* *M. racemosus*
September 1908	Kiefernmykorrhiza aus *Sphagnum*-Moor. Sognsvand bei Kristiania.	*M. Ramannianus* (*Fusarium* sp.)

Wie aus dieser kleinen Tabelle hervorgeht, können wir aus Kiefern- und Fichtenwurzeln, selbst wenn sie durch mehrtägiges Spülen in fliessendem Wasser gereinigt worden sind, eine verhältnissmässig reiche Pilzflora hervorzüchten. Natürlich können wir aber nicht darüber entscheiden, ob diese Arten von den innerhalb der Wurzeln lebenden Hyphen herrühren, oder ob sie vielleicht nur von den zwischen toten Rindenzellen lebenden Hyphen oder vielleicht auch von anhaftenden Sporen, stammen. Es giebt aber die Tabelle allenfalls die Pilzflora der Oberfläche der Wurzeln an, und sie verdient als solche wohl einiges Interesse.

In einer dritten Versuchsreihe endlich wurde versucht, die Oberfläche der Wurzeln durch kurze Behandlung mit starker Salzsäure oder Formol so gut wie möglich zu sterilisieren. Natürlich darf hierbei die Behandlung nur wenige Minuten (2—6) dauern, um den lebenden Zellen der Wurzeln nicht zu schaden. Auch hier haben sich, nachdem die Wurzeln auf Nähragar gebracht waren, in mehreren Fällen Mucorineen entwickelt und zwar aus Kiefernmykorrhizen die zwei Arten:

M. hiemalis
M. Ramannianus.

Eine absolute Entscheidung über die Rolle der Mucorineen bei der Mykorrhizafrage ist nun wie oben erwähnt aus derartigen Versuchen nicht zu erwarten. Ich halte es deshalb für überflüssig die einzelnen Versuche näher zu besprechen und gebe hier nur ein Verzeichnis der im ganzen von

mir auf Kiefern- und Fichtenwurzeln (nach mehrtägigem Spülen mit Wasser) gefundenen Arten:

Mucor Ramannianus	(Kiefer)
— *sphaerosporus*	(Kiefer, nur einmal)
— *racemosus*	(Kiefer)
— *hiemalis*	(Kiefer, Fichte)
— *silvaticus*	(Fichte)
Absidia Orchidis	(Kiefer)
— *cylindrospora*	(Kiefer, auch *Monotropa hypopitys*)
Zygorhynchus Moelleri	(*Pinus montana*).

Von besonderem Interesse sind aber zwei Versuche mit Mykorrhizawurzeln von Pflanzen, die in fast vollständig humusfreiem Boden lebten. Der eine Versuch betrifft die in unserem Lande ziehmlich selten vorkommende *Monotropa hypopitys* und der andere *Pinus montana.*

Im Herbst 1907 entdeckte ich bei Veldre auf Ringsaker eine Lokalität, wo die *Monotropa* ziemlich reichlich vorkam. Die Pflanze wuchs hier in zahlreichen Exemplaren an einem von verwittertem Schieferschutt bedeckten Abhang (»Fangberget«). Die spärliche Vegetation bildeten hier die Fichte (*Picea excelsa*) und an dem Boden zahlreiche Exemplare von *Monotropa* und *Vicia silvatica.* Der Boden war wie oben bemerkt fast vollständig humusfrei und bestand nur aus groberen und kleineren Schieferstücken in einer feinen Masse Schiefermehl eingebettet. Während nun in diesem Erdboden kein Pilzmycel sonst zu entdecken war, zeigte sich das ganze Wurzelsystem der *Monotropa* von einem dichten Hyphengewebe durchsponnen und eingefilzt und konnte als eine ganze Masse herausgenommen werden. Diese Masse (aus Wurzeln, Pilzhyphen und Erde bestehend) wurde in Papir eingepackt und schon am nächsten Tage im Laboratorium einer Analyse auf Pilze unterworfen. Drei Analysen von verschiedenen *Monotropa*pflanzen zeigten folgenden Pilzgehalt:

	I Sporen pr. Gram Erde	II Sporen pr. Gram Erde	III Sporen pr. Gram Erde
Absidia cylindrospora	2500	3050	4100
Penicillium glaucum f.	11500	15000	17500
Fungus (*Botrytis* sp.?)	1250	800	900

Endlich wurden auch kleine Partikeln von der Masse auf Agar fein verteilt, aber auch hier entwickelten sich nur dieselben drei Pilze. Eine Entscheidung darüber, welcher von diesen Pilzen als Mykorrhizapilz anzusehen ist, lässt sich natürlich hier auch nicht treffen, jedenfalls aber ist das Vorkommen dieser artenarmen Gesellschaft in der fast humusfreien

Erde interessant, und eben *Absidia cylindrospora* hat sich auch bei anderen Versuchen als eine in humusfreiem Schieferschutt mehrmals vorkommende Art gezeigt.

Im Sommer 1907 hatte ich in einer Pflanzenschule bei Söfteland südlich von Bergen Gelegenheit die Mykorrhizen von der Bergkiefer *Pinus montana* näher zu studieren.

An einem Kies- und Sandboden (aus Kies und Sand bestehend und vollständig humusfrei) waren vor einigen Jahren junge Pflanzen von *P. montana* ausgepflanzt worden.

Die Pflanzen gediehen anfangs nur schlecht, bald aber besser und besser und hatten zur Zeit meines Besuches eine Höhe von ungefähr 1 m. erreicht. Beim Herausgraben einiger Wurzeln zeigten sich diese überall mit kräftig entwickelten Mykorrhizabildungen befallen. Wurzelstücke, mit Wasser gereinigt und auf Nähragar gelegt, zeigten alle Entwickelung von *Penicillium glaucum* und zudem auch von *Zygorhynchus Moelleri*. Es errinnerte mich dies augenblicklich an den Versuchen A. Möllers (1903), und um die Pilzvegetation hier näher zu studieren, wurde zwischen den mykorrhiza-zeigenden Wurzeln die Erde mittelst sterilisierter Pinzetten ausgegraben und in sterilen Kolben aufgesammelt und darauf einer gewöhnlichen Analyse auf Pilze unterworfen. Es wurde vier Erdproben von drei verschiedenen Bäumen untersucht und zwar mit dem in der folgenden Tabelle gegebenen Resultat.

Pilzgehalt zwischen mykorrhizabefallenden Wurzeln von *Pinus montana* auf Sand und Kies gewachsen:

	Baum I Sporen pr. Gram Erde	Baum I Sporen pr. Gram Erde	Baum II Sporen pr. Gram Erde	Baum III Sporen pr. Gram Erde
Zygorhynchus Moelleri	250	210	280	300
Penicillium glaucum	15000	18000	12000	11000

Es waren also zwischen den Wurzeln hier nur zwei Pilze nachweisbar, diese aber beide in recht bedeutenden Mengen. Zum Vergleich wurde nun auch von dem Erdboden zwischen den Bäumen — ausserhalb ihres Wurzelsystems — zwei Analysen ausgeführt, und zwar mit dem Resultat, dass dieselben zwei Pilze wenn auch mit sehr geringer Sporenzahl hier wiedergefunden wurden:

	Probe I Sporen pr. Gram Erde	Probe II Sporen pr. Gram Erde
Zygorhynchus Moelleri	20	1—2
Penicillium sp.	1000	100

In welchem Verhältnis nun diese zwei Pilze zu den Mykorrhiza-bildungen der Kiefer hier standen, liess sich nicht entscheiden. Interessant

ist aber, dass auch hier *Zygorhynchus Moelleri* in grossen Mengen zwischen den Wurzeln zu finden war, und somit A. Möllers Annahme (1903), wonach eben dieser Pilz zur Mykorrhizabildung bei der Kiefer befähigt sei, allenfalls in diesem Falle nicht im Wege steht.

Von Interesse sind auch zwei Analysen von Erde zwischen Wurzeln von *Pinus montana*, die auf die *Calluna*-Heide ausgepflanzt waren und in dem sauren, sehr humösen Boden hier recht gut gediehen. Auch hier wurde ausser der gewöhnlichen Mucorineen-Vegetation dieser Heide *Zygorhynchus Moelleri* gefunden, während er sonst in den Analysen von diesem Erdboden nur ein einziges Mal und recht spärlich gefunden ist. Die Analysen des Heidebodens zwischen den Wurzeln der Kiefer zeigte nämlich:

	I Sporen pr. Gram Erde	II Sporen pr. Gram Erde
Absidia Orchidis	2000	2000
Mucor Ramannianus	150	800
Zygorhynchus Moelleri	150	180

5. Die pilzbewohnenden Mucorineen.

Unsere Kenntnis von den an höheren Pilzen vorkommenden Mucorineen ist bis jetzt eine sehr lückenhafte und die biologischen Verhältnisse dieser Pilze bedürfen eben dringend einer neuen Bearbeitung. Es scheint mir aber im Voraus sehr wahrscheinlich, dass wir schon mit unserer heutigen Kenntnis von ihrem Auftreten hier zwei biologisch verschiedene Gruppen unterscheiden können.

Zu der ersten Gruppe, die ich als die fakultativ pilzbewohnenden Mucorineen bezeichnen werde, können vielleicht sämtliche im Erdboden vorkommende Arten gerechnet werden, hier aber sollen als typische Vetreter dieser Gruppe besonders die zwei *Mucor*-Arten, *Mucor silvaticus* und *Mucor flavus*, dann auch mehrere *Mortierella*-Arten erwähnt werden. Besonders *Mucor silvaticus* habe ich mehrmals von verfaulenden Agaricineen auf dem Waldboden isolieren können, relativ seltener dagegen *M. flavus*, der doch von Bainier (1903) auch auf verfaulenden Pilzen mehrmals gefunden ist. Die verschiedenen *Mortierella*-Arten endlich sind nach Fischer (Kryptogamen-Flora) recht häufig an verfaulenden höheren Pilzen zu finden, und ich habe auch selbst jetzt drei verschiedene *Mortierella*-Arten in Kultur, die alle an derartigem Substrate angetroffen sind. Alle diese Mucorineen sind aber im Erdboden recht häufig, und mehrere Arten wie *Mucor silvaticus* und *flavus* und wenigstens eine

der von mir isolierten *Mortierella*-Arten haben ohne Zweifel im Erdboden ihre eigentlichen Brutstellen und kommen nur gelegentlich an verfaulenden höheren Pilzen vor, die ihnen durch ihren Gehalt an Kohlenhydrate und Stickstoffverbindungen einen guten Nährboden darbieten. Es sind diese im Erdboden ausgebreiteten Arten also nur als fakultative Pilzbewohner anzusehen.

Ganz anders darf sich nun die Sache bei der zweiten Gruppe, die wahrscheinlich mehr oder wenig obligat pilzbewohnenden Mucorineen, verhalten. Diese Gruppe umfasst die drei Gattungen *Spinellus, Dicranophora* und *Sporodinia* mit zusammen 8 bekannten Arten, die alle (vielleicht doch mit Ausnahme von *Sporodinia Grandis*) nur auf verfaulenden Pilzen gefunden sind. Die erste Gattung *Spinellus*, wozu gewöhnlich 5 Arten gezählt werden, ist, soweit mir bekannt, ausschliesslich an höheren Pilzen gefunden, und zwar kommt die eine Art, *Sp. fusiger* hier recht häufig vor, während die anderen vier etwas seltener zu sein scheinen. Die Gattung *Dicranophora* ist überhaupt nur dreimal gesehen, zum ersten Male als *D. fulva* von SCHRÖTER (1886) bei Rastatt in Deutschland (1877 und 1879), dann in unseren Tagen von THAXTER in Amerika (*Dicranophora* sp. bei BLAKESLEE, 1904) und endlich von RENÉ MAIRE bei Boliana in Taygéle in der Nähe von Sparta (Von VUILLEMIN als *Dicranophora fulva* SCHRÖTER bestimmt, 1907). Alle diese drei Funde sind an verfaulenden Hutpilzen (*Paxillus*, *Gomphidius* und *Boletus*) gemacht. Die Gattung *Sporodinia* endlich umfasst nur die einzige Art, *Sporodinia Grandis*, die nach FISCHER (Kryptogamenflora) meist an verfaulenden höheren Pilzen, doch wohl gelegentlich auch an faulenden Früchten (Birnen) vorkommt.

Von diesen drei Gattungen mit ihren acht bekannten Arten habe ich nun während meiner Untersuchungen nur *Sporodinia Grandis* angetroffen und zwar diese nur ein einziges Mal — im Herbst 1907 an verfaulenden Agaricineen im Fichtenwalde bei Dröbak in der Nähe von Kristiania.

Es ist mir nun besonders auffallend gewesen, dass ich in meinen zahlreichen Erdbodenanalysen diese pilzbewohnenden *Spinellus*-, *Dicranophora*- und *Sporodinia*-Arten nie angetroffen habe. Auch LENDNER hat in seiner letzten Arbeit (1908 b) in dem Verzeichnis über die aus dem Erdboden isolierten Mucorineen keine *Dicranophora*, keinen *Spinellus* und keine *Sporodinia Grandis*, — nur diese letzte hat auch er an verfaulenden Pilzen angetroffen.

Es liegt nun die Annahme sehr nahe, dass diese drei Mucorineen-Gattungen in ihrer Entwickelung mehr oder weniger zu verfaulenden Pilzen gebunden sind, und dass sie hier vielleicht eben ihre natürlichen Brutstellen haben. Eine nähere Untersuchung über diese Gattungen be-

sonders mit Rücksicht auf ihre Biologie und Biochemie wäre sehr erwünscht; vor allem stellt sich dann die Frage nach ihrem Verhältnis zu dem speziellen Substrate, den verfaulenden Hutpilzen, ob sie mehr oder weniger ausgeprägte Parasiten oder, wie es FISCHER (Kryptogamenflora) annimmt, nur gewöhnliche Saprophyten sind.

Wir wissen doch von diesen Pilzen noch viel zu wenig, und es ist daher nur eine vorläufige obwohl recht wahrscheinliche Einteilung, wenn wir also zwischen fakultativ pilzbewohnenden Mucorineen wie *M. silvaticus*, *M. flavus* und vor allem mehreren *Mortierella*-Arten und obligat pilzbewohnenden Mucorineen wie den Gattungen *Spinellus, Dicranophora* und wahrscheinlich auch *Sporodinia* unterscheiden. Die ersteren kommen im Waldboden häufig und regelmässig vor und haben hier ihre natürlichen Brutstellen; die letzteren dagegen sind im Erdboden noch nicht nachgewiesen worden, sondern bis jetzt nur von verfaulenden Hutpilzen bekannt und haben wahrscheinlich auf diesen ihre eigentlichen Brutstellen.

6. Norwegische Mucorineen, die noch nicht im Erdboden gefunden worden sind.

Der Vollständigkeit halber müssen hier vier Arten erwähnt werden, die ich bis jetzt nur aus der Luft oder an zufälligen Substraten, nie aber aus dem Erdboden isoliert habe. Es sind diese:

Mucor circinelloides
— *arrhizus*
Sporodinia Grandis
Thamnidium elegans.

Mucor circinelloides ist mehrmals besonders beim Exponieren von Petrischalen mit sterilisiertem Reis aus der Luft isoliert worden.

Mucor arrhizus wurde im Frühlinge 1906 mehrmals aus der Luft im Zentrum Kristianias isoliert, später habe ich ihn aber nicht wiedergefunden.

Sporodinia Grandis ist nur ein einziges Mal (Herbst, 1907), an verfaulenden Pilzen (Agaricineen) im Fichtenwalde bei Dröbak gefunden.

Thamnidium elegans ist einige Male aus der Luft sowohl im Kristiania wie auch im westlichen Norwegen (Söfteland bei Bergen) isoliert worden.

Kap. II. Kulturmethoden, Mineralsalzlösung etc.

Für die verschiedenen Kulturversuche sind immer absolute Reinkulturen verwendet, d. h. Kulturen, die aus einer einzigen Spore stammen. Um solche Kulturen zu gewinnen habe ich mich immer der von mir (1908) beschriebenen Methode bedient. Diese Methode, die eine genaue mikroskopische Kontrolle gestattet, ist überhaupt für die Reinkultur von Schimmelpilzen sehr verwendbar und leistet immer gute Dienste.

Es darf wohl hier auch die verwendete Lösung von Mineralsalzen erwähnt sein. Ich habe hier absichtlich eine möglichst einfache Lösung verwendet. Kompliziertere Lösungen wie die RAULIN'sche sind überhaupt bei physiologischen Kulturversuchen zu vermeiden, da wir noch über die Wirkung ihrer vielen Bestandteilen an den verschiedenen Ernährungsprozesse sehr wenig wissen. Durch die Untersuchungen von BENECKE (1894—1895—1896) und MOLISCH (1894) wissen wir, dass die Pilze der Elemente S, P, K und Mg bedürfen, und in Übereinstimmung hiermit habe ich bei sämtlichen Kulturversuchen folgende Nährsalzlösung verwendet:

1000 Cm^3 Wasser
0,5 g. KH_2PO_4
0,5 g. $MgSO_4$
10 Tropfen einer 1 % $FeCl_3$-Lösung.

Diese Nährsalzlösung ist später in dieser Abhandlung als »**gewöhnliche Salzlösung**« bezeichnet worden.

Die Stickstoff- und Kohlenstoffquellen sind zu dieser Lösung gewöhnlich in 1 oder 2 prozentiger Konzentration gegeben. Höhere Konzentrationen besonders von Kohlenstoffverbindungen, vertragen viele der Erdboden-Mucorineen nur schlecht.

Hinsichtlich der Sterilisation von Nährlösungen mag endlich erwähnt werden, dass ich eine Sterilisierung bei Überdruck immer vermieden habe. Besonders viele der benutzten Stickstoffverbindungen, aber auch mehrere Kohlenstoffverbindungen, erleiden hierdurch Veränderungen; aus den ersteren wird häufig Ammoniak abgespalten, und die letzteren können z. B. allenfalls ein wenig hydrolysiert werden. Um jedoch bakterienfreie Kulturen zu gewinnen, habe ich sämtliche Kulturgefässe sowie das zu der Nährlösung zu verwendende Wasser immer eine halbstündige Sterilisation

bei 2 Atm. Überdruck (133° C.) unterworfen. Darauf sind dann die Nährstoffe dem Wasser zugewogen, die Lösung in den Kulturgefässen verteilt und endlich durch Sterilisation bei 100° C. im Dampfsterilisator an drei aufeinander folgenden Tagen vollständig keimfrei gemacht.

Für sämtliche Versuche sind endlich chemisch reine Verbindungen verwendet worden, die meisten (wie Aminosäuren) von Merck bezogen.

Es muss noch erwähnt werden, dass ich häufig bei der Untersuchung von Nährlösungen eine Titrierung mit $\frac{n}{50}$ Schwefelsäure oder Barytwasser angewendet habe. Hierbei bediente ich mich von Kongorot als Indikator und als Neutralpunkt ist das Umschlagen der blauen oder weinroten Farbe der sauren Lösung in die rein rote der alkalischen angesehen worden. Die sauren Nährlösungen konnten dabei ohne weiteres mit Barytwasser titriert werden, den alkalischen dagegen wurde ein gemessener Überschuss Schwefelsäure zugetröpfelt, bis eine deutlich blaue Färbung eintrat, und dann mit Barytwasser bis zum Hervortreten der rein roten Farbe zurücktitriert.

Es darf vielleicht auch betont werden, dass das Ziel dieses Titrierens nur eine Bestimmung von der Titrationsazidität- oder alkalität gewesen ist. Das Verfahren unterscheidet natürlich nicht zwischen starken und schwachen Säuren, zeigt also nicht die Ionenazidität- oder alkälität, sondern nur die Summe der potentiellen und aktuellen OH- oder H-Ionen. Trotzdem ist aber dieses Titrieren von Bedeutung und eine Bestimmung der Titrationsazidität- oder alkalität giebt in der Tat häufig eine Erklärung von den chemischen Prozessen, die in der Nährlösung vorgegangen sind. Dagegen ist also das Verfahren für Bestimmung der Ionenazidität- oder alkalität nur wenig brauchbar und darf hier nur mit grosser Kritik angewendet werden. (Vergleiche hier: Höber: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe p. 146—47).

Das mehr oder wenig gute Wachstum habe ich in den Tabellen durch eine verschiedene Zahl von Kreuzen (×) angegeben. Hierbei bedeutet:

o	Kein Wachstum
o—×	Keimung der Sporen aber unbedeutendes Wachstum
×	Relativ schlechtes Wachstum
××	Mittelstarkes Wachstum
××× oder ××××	Gutes bis sehr gutes Wachstum.

In derselben Weise wird auch das Verhältnis mehrerer anderen Faktoren, w. z. B. Reaktion der Nährlösung mit Griess oder Nessler, Oxalsäureproduktion u. s. w., angegeben.

Kap. III. Die Stickstoffresorption der Mucorineen.

1. Nitrite und Nitrate.

Während für die Assimilation von Nitraten und besonders dem Ammoniakstickstoffe durch Pilze bereits bedeutend umfangreiche Erfahrungen vorliegen, wissen wir von der Anwendbarkeit der Nitrite als N-Quelle für diese Organismen relativ sehr wenig. Zwar haben schon WINOGRADSKY und OMELIANSKY (1899) einen Schimmelpilz erwähnt, der in ihren Nitritlösungen als Verunreinigung auftrat. Sie züchteten den Pilz in Nitritlösungen weiter und zeigten dabei, dass das Nitrit hier ohne eine vorausgehende Oxydation zu Nitrat assimiliert wurde.

Jedoch blieb für mehrere Jahre die alte Tatsache bestehen, wonach es die Nitrite nicht nur als N-Quelle für die Pilze untauglich waren, sondern auch durch ihre Giftigkeit eine direkt schädliche Einwirkung ausübten.

Erst vor einigen Jahren wies TREBOUX (1904) in einer vorläufigen Mitteilung nach, dass die Wirkung der Nitrite in erster Linie von der Reaktion der Nährlösung abhängig wäre. In sauren Lösungen wurde nämlich die salpetrige Säure aus ihren Verbindungen frei gemacht und erst der freien Säure HNO_2 kamen die schädlichen Wirkungen zu. In alkalischer Lösung dagegen erwiesen sich die Nitrite als ziemlich gute N-Quelle und standen mit Rücksicht auf Nährwert den Nitraten nicht nach.

Eine nähere Untersuchung über das Verhalten der Nitrite den Pilzen gegenüber hat erst RACIBORSKI (1906 — P. 734) vorgenommen. Mit Hilfe der Methode der elektiven Kultur isolierte er in einer Nährlösung mit 5 % Saccharose und 2 % Natriumnitrit zwei Pilze, den einen eine Rosahefe, den anderen eine *Cylindrotrichum*-Art. Der letztere wurde in vergleichenden Kulturen mit $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ und $NaNO_2$ gezüchtet, und es zeigte sich dabei, dass mit $NaNO_2$ und alkalischer Nährlösung ein entscheidend höheres Erntegewicht gefunden wurde als in Kulturen mit Sulfat oder Nitrat. In einem anderen Versuche mit *Aspergillus niger* in Saccharose-Nitritlösungen entwickelte sich dieser dagegen sehr schlecht, was wohl aber durch seine Oxalsäureproduktion genügend erklärt wurde. Allerdings lieferte auch dieser Pilz nach Neutralisation mit Karbonaten eine obwohl nur mässige Ernte. RACIBORSKI zieht daher den Schluss, dass die Nitrite nur für Pilze, die keine organischen Säuren produzieren, als N-Quelle Verwendung finden.

Die Nitrite, meint er, werden dabei als solche, d. h. als Nitrition, aufgenommen, ohne dass eine vorausgehende Reduktion zu Hydroxylamin oder Ammoniak stattfindet.

Was nun die Assimilation von Nitraten betrifft, so sind doch unsere Erfahrungen hierüber bedeutend grösser. Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, dass eine Reihe von Pilzen mit Nitraten als einzige N-Quelle gut herauskommen, und in der Tat ist ja Kaliumnitrat eine der in den Laboratorien am häufigsten beim Züchten von Schimmelpilzen verwendeten Stickstoffverbindungen. Jedoch dürfen wir wohl sagen, dass unsere Kenntnis von der pilzlichen Nitratassimilation eine sehr lückenhafte ist. Erstens liegen über das Verhalten der verschiedenen Pilzabteilungen, Gattungen und Arten nur äusserst spärliche Erfahrungen vor, und zweitens wissen wir von den chemischen Prozessen, die sich bei der Nitratassimilation abspielen, gar nichts.

Schon LAURENT (1889 — P. 371) hat hervorgehoben, dass sich die verschiedenen von ihm untersuchten Pilze den Nitraten gegenüber sehr verschieden verhalten, indem einige wie z. B. *Aspergillus niger* mit KNO_3 schlechter gedeiht als mit Ammoniumphosphat, andere dagegen wie *Alternaria tenuis* und *Mucor racemosus* mit Kaliumnitrat viel besser herauskommen. Eine Reihe von Pilzen wie *Cladosporium herbarum*, *Penicillium glaucum*, *Alternaria tenuis* und *Mucor racemosus* besitzen nach LAURENT die Eigenschaft, die Nitrate zu reduzieren und dadurch für ihre Stickstoffassimilation verwendbar zu machen.

Von anderen Erfahrungen, die auf diesem Gebiete vorliegen mögen die von WENT und PRINSEN GEERLIGS (1895 a und b) gemachten Beobachtungen erwähnt werden, wonach es der von ihnen studierte *Chlamydomucor Oryzae* zu seiner Verzuckerung von Reis zwar Pepton, Asparagin und Ammoniumsalze als N-Quelle verwendet, gar nicht aber Nitrate und Nitrite.

Während meiner Untersuchungen über die Biochemie der erdbewohnenden Mucorineen habe ich nun auch ihre Fähigkeit, diese hochoxydierten anorganischen Stickstoffverbindungen zu assimilieren, geprüft, und ausserdem die sich bei ihrer Assimilation abspielenden chemischen Prozesse etwas näher studiert.

Schon meine ersten Kulturversuche, wobei Glukose als C-Quelle und die respektiven Stickstoffverbindungen, Nitrite und Nitrate, als einzige N-Quelle geboten wurden, zeigten, dass sich die Mucorineen hier recht verschieden verhalten. Eine geringere Anzahl von Arten war nämlich im Stande aus Kaliumnitrit oder -nitrat ihren vollen Stickstoffbedarf zu decken, während sich die Mehrzahl mit diesen Stickstoffverbindungen gar nicht entwickelten, und zwar schienen schon die ersten Versuche zu zeigen, dass

es eben dieselben Arten waren, die mit Nitraten herauskamen als die, die mit Nitriten gut gediehen. Um dieses Resultat näher zu kontrollieren, sind nun eine recht beträchtliche Zahl von Versuchen unter möglichst variierten Bedingungen ausgeführt worden und mit Rücksicht auf das Verhältnis: Nitrat- resp. Nitritassimilation oder nicht, stimmen sie so vollkommen überein, dass es wohl genügt, nur einen der letzten Versuche, der mit einer möglichst grossen Zahl von Arten ausgeführt wurde, hier anzuführen.

Versuch Nr. 1.

Petrischalen mit Nähragar: 1 % Glukose, gewöhnliche Salzlösung, 1 % Agar-Agar und dazu

Serie A — 1 % Kaliumnitrat (KNO_3)
Serie B — 1 % Kaliumnitrit (KNO_2).[1]

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 5-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

Serie A (Nitrat)	Serie B[1] (Nitrit)

Sehr gute Entwickelung mit sowohl kräftigem Wachstum als reichlicher Fruktifikation zeigten folgende Arten:

Mucor racemosus	*Mucor racemosus*
— *Christianiensis*	— *Christianiensis*
— *sphaerosporus*	— *sphaerosporus*
— *griseo-cyanus*	— *griseo-cyanus*
— *genevensis*	— *genevensis*
— 179, a	— 179, a
— 174, a	— 174, a
— *spinosus*	— *spinosus*
— *circinelloides*	— *circinelloides.*

Ein etwas weniger üppiges Wachstum, das jedoch eine bedeutende Nitrat- resp. Nitritassimilation voraussetzt, zeigte:

Mucor dispersus	*Mucor dispersus.*

[1] In der Serie B mit Kaliumnitrit war die Nährlösung vor dem Versuche etwas zu viel alkalisch und ausserdem etwas trübe. Es wurde daher in dieser Serie 0,05 % Zitronensäure zugesetzt, wodurch die Lösung klar und nur schwach alkalisch wurde.

Äusserst spärliches Wachstum mit dünnen Hungerhyphen und nur einzelnen zerstreuten Sporangienträgern zeigten:

Mucor strictus	*Mucor strictus*
— *piriformis*	— *piriformis*
— *saturninus*	— *saturninus*
— *Ramannianus*	— *Ramannianus*
— *flavus*	— *flavus*
— *hiemalis*	— *hiemalis*
— *stolonifer*	— *stolonifer*
— *nodosus*	— *nodosus*
Absidia Orchidis	*Absidia Orchidis*
— *glauca*	— *glauca*
— *cylindrospora*	— *cylindrospora*
Zygorhynchus Moelleri	*Zygorhynchus Moelleri*
Thamnidium elegans	*Thamnidium elegans*
Mortierella Isabellina (Nr. 611)	*Mortierella Isabellina* (Nr. 611)

In der Tat haben die Kulturversuche hier ein durchaus entscheidendes Resultat gegeben. Entweder wird üppiges Wachstum und reichliche Fruktifikation gefunden, was eine energische Nitrat- resp. Nitritassimilation beweist, oder das Wachstum ist äusserst gering mit dünnen Hungerhyphen und zerstreuten Sporangienträgern — eine recht kümmerliche Entwickelung, die wohl nur durch die in den Sporen und dem Agar sich befindenden Nährstoffe ermöglicht wird. Auch Kulturen in einer entsprechend zusammengesetzten Nährlösung (50 Cm^3 in Erlenmeyerkolben) haben dasselbe Resultat gegeben. Die Entwickelung der nicht Nitrat- resp. Nitrit-assimilierenden Arten ist hier äusserst gering und führt nur zur Bildung kleiner submersen Mycelflocken.

Es ist nun interessant zu sehen, wie es ohne Ausnahme eben dieselben Arten sind, die Nitrate assimilieren können als die, welche auch Nitrite anwenden. Diese Übereinstimmung, die also derart formuliert werden kann, dass bei den Mucorineen sowohl die Fähigkeit Nitrate zu assimilieren wie die Fähigkeit Nitrite zu assimilieren denselben Arten zukommen, deutet darauf, dass die chemischen Prozesse, die sich bei den zwei Assimilationsprozessen abspielen, wahrscheinlich von gleichartiger Natur sind, und dass sie durch eine und dieselbe spezielle Eigenschaft dieser Arten bedingt wird. Wir müssen wohl hier vor allem an eine Reduktionsfähigkeit der betreffendenden Arten denken, wobei die Nitrate über Nitrite zu Hydroxylamin oder Ammoniak reduziert werden.

Ehe aber auf den eventuellen Reduktionsprozess eingegangen wird, mag es von Interesse sein diese Stickstoffassimilation aus hochoxydierten anorganischen Verbindungen etwas näher in ihrem Verhältnis zu der gleichzeitig dargebotenen Kohlenstoffquelle etwas näher zu studieren. Da eine solche Untersuchung in der Peripherie meiner Aufgabe liegt, habe ich nur wenige derartige Versuche ausgeführt. Diese haben aber zum Teil recht interessante Resultate gegeben, so dass ich hier einige davon anführe.

Versuch Nr. 2.

Reagensgläser mit Nährlösung: 1 % KNO_3, 2 % Kohlenstoffverbindung und gewöhnliche Salzlösung.

Als Kohlenstoffquelle wurde in 2 % Koncentration verwendet:

Glukose, Lävulose, Inulin, Mannit, Glyzerin.

Temperatur 15—18° C. Schwach diffuses Tageslicht.

Es wurden hier nur sieben der nitratassimilierenden Arten kultiviert und zwar waren diese: *M. racemosus*, *M. Christianiensis*, *M. sphaerosporus*, *M. griseo-cyanus*, *M. dispersus*, *M. genevensis* und *M. spinosus*.

Eine Untersuchung der verschiedenen Kulturserien nach 26-tägiger Kulturdauer gab die folgenden Resultate.

1. Glukose.

Hier haben sich sämtliche sieben Arten sehr gut entwickelt. Eine Untersuchung der Kulturflüssigkeit mit dem gewöhnlichen Griess'schen Reagens gab überall eine deutliche, obwohl in Stärke variierende Nitritreaktion, die besonders bei *M. sphaerosporus*, *M. racemosus* und *M. genevensis* sehr deutlich war (augenblickliche, tiefe Rotfärbung), bei den vier anderen Arten etwas weniger kräftig (starke Rotfärbung tritt erst nach einer Minute ein).

2. Lävulose.

Auch hier war mit Ausnahme von *M. dispersus* überall gute Entwickelung. Die Nitritreaktion stimmt meist mit den Glukose-Kulturen überein, nur scheint sie bei *M. spinosus* fast zu fehlen. *M. dispersus* entwickelt sich mit Lävulose nur sehr schlecht.

3. Inulin.

Die Inulinkulturen zeigen ein sehr abweichendes Verhältnis, indem hier nur *M. spinosus* ein obwohl auch sehr kümmerliches Wachstum zeigt, während die anderen Arten ganz ohne Entwickelung bleiben.

4. Mannit.

Mannit scheint als Kohlenstoffquelle bei der Stickstoffassimilation aus Nitraten sowohl Glukose wie Lävulose weit nachzustehen. In den Kulturen entwickeln sich hier *M. Christianiensis* und *M. spinosus* ganz gut und stehen den Monosaccharidkulturen nur wenig nach. Drei andere Arten: *M. racemosus, M. sphaerosporus* und *M. griseo-cyanus* zeigen ein wenig energisches Wachstum und *M. dispersus* und *M. genevensis* sind ohne jede Entwickelung. Die Nitritreaktion ist bei denen sich am besten entwickelnden Arten: *M. spinosus, M. Christianiensis, M. sphaerosporus* und *M. racemosus* ausserordentlich stark (mit dem Griess'schen Reagens eine augenblickliche tiefrote Färbung) und häufig viel stärker als in den Kulturen mit Monosacchariden.

5. Glyzerin.

In dieser Reihe hat sich nur *M. racemosus* und *M. griseo-cyanus* mässig entwickelt, während *M. Christianiensis* und *M. sphaerosporus* ein äusserst kümmerliches Wachstum zeigen. Sämtliche diese vier Arten zeigen in ihrer Kulturflüssigkeit eine ebenso starke Nitritreaktion wie die der Mannitkulturen. Endlich haben die drei Arten: *M. spinosus, M. dispersus* und *M. genevensis* gar nicht gekeimt.

Soweit wir aus diesem und zwei anderen hier nicht angeführten Versuchen schliessen dürfen, scheint es als ob die Monosaccharide gewöhnlich für eine Nitratassimilation die günstigen Bedingungen bieten. Die Biosen und Polyosen, wie Rohrzucker und Inulin, können nur Verwendung finden wenn sie durch eventuelle Enzyme zu Monosen hydrolysiert werden. Mehrwärtige Alkohole endlich wie Glyzerin und Mannit, können nur in beschränkter Weise Verwendung finden und mehrere Arten wie *M. genevensis* und *M. dispersus* gedeihen bei der Nitratassimilation mit diesen C-Quellen nicht.

Durch die oben angeführten Versuche ist nun bewiesen worden, dass eine Anzahl von Mucorineen die Fähigkeit besitzen, Nitrate und Nitrite zu assimilieren. Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise diese Assimilation stattfindet und welche chemischen Veränderungen den zu assimilierenden Verbindungen erst unterliegen müssen.

Schon LAURENT (1889 — p. 371) behauptet für Hefe und Schimmelpilze, dass die Nitratassimilation erst durch eine Reduktion ermöglicht wird. Tatsächlich ist nun eine Reduktion die einzige natürliche Annahme, es wird aber noch hier nach den einzelnen Stufen dieses Reduktionsprozesses gefragt, — vor allem wie weit derselbe gehen darf, ehe das

Stickstoff für die Eiweisssynthese Verwendung finden kann. Hierüber liegen bis jetzt für die Schimmelpilze äusserst wenige Erfahrungen vor.

BEIJERINEK (1900) erwähnt kurz, dass der im Erdboden häufig vorkommende *Streptothrix chromogena* mit Nitraten als N-Quelle gut gedeiht und diese Verbindungen schnell in Nitrite überführt (reduziert).

RACIBORSKI hat in seiner oben zitierten Arbeit (1906 — p. 735) einen Versuch mit der von ihm isolierten *Cylindrotrichum*-Art beschrieben. Der Pilz wurde hier in alkalischer Nährlösung mit Natriumnitrit und Saccharose gezüchtet und die Kulturflüssigkeit zeigte nach einer Kulturdauer von $4^1/_2$ Monaten keine Reaktion auf Hydroxylamin oder Ammoniak. Dieser Verfasser schliesst daraus, dass das Nitrit-Ion als solches assimiliert wird.

Wie oben bemerkt, behauptet LAURENT eine Reduktion, die allenfalls bis auf Nitrit geht.

Um einen eventuellen Reduktionsprozess etwas näher studieren zu können, habe ich nun teils mehrere Versuche angestellt, teils bei Versuchen, die in ganz anderer Hinsicht ausgeführt wurden, die Kulturflüssigkeit auf Nitrite und Ammoniak untersucht.

Besonders sind viele Kulturen mit Natriumnitrat und wechselnden Mengen von Kohlenstoffverbindungen, vornehmlich Traubenzucker, mit dem Griess'schen Reagens oder mit Jodkalium-Stärke untersucht worden. Hierbei hat sich nun in den meisten dieser Kulturen Nitrit nachweisen lassen. Ich muss hier jedoch gleich bemerken, dass die Nitritreaktion selbst mit dem äusserst empfindlichen Griess'schen Reagens nicht immer auftritt, vielmehr aber in ihrem Auftreten von noch nicht klargelegten Verhältnissen abhängt. So ist in einigen Versuchen mit Traubenzucker als C-Quelle für eine ganze Reihe von nitratassimilierenden Mucorineen eine selbst mit der Jodkalium-Stärke-Probe deutliche Nitritreaktion gefunden; in anderen Versuchen dagegen, die von diesen ersteren nur durch eine etwas kürzere Kulturdauer abweichen, ist die Nitritreaktion selbst mit dem weit empfindlicheren Griess'schen Reagens beinahe negativ ausgefallen.

Auch mit der gleichzeitig dargebotenen Kohlenstoffquelle scheint die Nitritreaktion zu variieren, und zwar ist sie häufig je stärker, je schlechter die Kohlenstoffverbindung ist, d. h. je langsamer der Pilz wächst. Mit Glyzerin oder Mannit sind häufig die in der Kulturflüssigkeit nachweisbaren Nitritmengen viel grösser als in Kulturen mit Glukose oder Lävulose.

Das Auftreten von Ammoniak ist in den meisten Nitratkulturen mit Nesslers Reagens leicht nachweisbar, doch ist auch hier in einzelnen Versuchen diese Reaktion beinahe negativ ausgefallen.

Es bedarf wohl hier nur einige meiner recht zahlreichen Versuche angeführt zu werden.

Versuch Nr. 3.

Erlenmeyerkollen mit Nährlösung (50 Cm^3): 1 % Kaliumnitrat, 1 % Glukose und gewöhnlicher Salzlösung.

Temperatur 20—21° C. Ohne Lichtzutritt.

Alkalität der Nährflüssigkeit vor dem Versuche: 0,3 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung (Kongorot).

Nach 5-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Azidität mit $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Kulturfl.keit gemessen (Kongorot)	Nitrit mit der Jodkalium-Stärke Probe	Ammoniak mit Nesslers Reagens
M. racemosus	16,5 Cm^3	×	××
M. Christianiensis	18,5	×	××
M. sphaerosporus	8,0	×	×
M. circinelloides	9,0	×	o
M. griseo-cyanus	12,5	×	×
M. spinosus	10,0	×	××
Mucor 153	11,5	×	×
Mucor 179, a	12,0	×	×

Versuch Nr. 4.

Reagensgläser mit Nährlösung: Überall 1 % Kaliumnitrat, dazu 2 % Glukose, Lävulose oder Mannit. Gewöhnliche Salzlösung.

Temperatur 18° C. Diffuses Tageslicht.

Nach 14 Tagen wurde gefunden:

	A. Glukose Reaktion mit Griess		B. Lävulose Reaktion mit Griess		C. Mannit Reaktion mit Griess	
M. racemosus	×	Wachstum überall gut (×××)	×	Wachstum gut (×××) mit Ausnahme von *M. dispersus*	o—×	Wachstum ziemlich gut bei *M. Christianiensis* und *M. spinosus*. Sonst keine Entwickelung
M. Christianiensis	××		××		××××	
M. sphaerosporus	×××		×××		o—×	
M. griseo-cyanus	××		××		o—×	
M. dispersus	×		××		o—×	
M. genevensis	××		××		o—×	
M. spinosus	×		o		××××	

Um die eventuelle Abhängigkeit der Reduktion von der Konzentration der Kohlenstoffquelle zu untersuchen, wurde folgender Versuch angestellt.

Versuch Nr. 5.

Erlenmeyerkolben mit Nährlösung: 1 % Kaliumnitrat dazu
in Serie A — 0,2 % Glukose
» Serie B — 3 % Glukose.

Nach 7 Tagen wurde gefunden:

	Serie A (0,2 % Glukose)			Serie B (3 % Glukose)		
	Wachstum	Griess	Nessler	Wachstum	Griess	Nessler
M. racemosus	××	o	o	××	o	×
M. Christianiensis	××	××	o	×××	o	×
M. sphaerosporus	×	×	o—×	×××	o	o—×
M. genevensis	×	o	×	×	×	××
M. spinosus	×	o—×	o	×	o	××
Kontrolle (ohne Infektion)	o	o	o—×	o	o	o

Endlich wurde ein Versuch angestellt, bei welchem die Nährlösung erst nach längerer Zeit untersucht wurde:

Versuch Nr. 6.

Erlenmeyerkolben mit je 50 Cm^3 Nährlösung: 1 % Kaliumnitrat (KNO_3), 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach einer Kulturdauer von 23 Tagen wurde gefunden:

	Reaktion der Nährlösung mit		
	Griess	Jodkalium-Stärke	Nessler
M. sphaerosporus	××	××	o—×
M. Christianiensis	××	××	×
Kontrolkolbe (ohne Infektion)	o	o	o

In der obigen Darstellung sind nun die Nitratkulturen behandelt. Es mögen aber hier auch die Nitritkulturen etwas näher besprochen werden. Teils sind Versuche auf festem Nährsubstrat ausgeführt, die zur Kontrolle des Wachstums und der Fruktifikation dienen sollten, teils sind aber auch Kulturversuche in Nährflüssigkeiten angestellt, um die Reaktion dieser und vor allem das Auftreten von Ammoniak näher untersuchen zu können. Als Beispiel sind folgende Versuche angeführt.

Versuch Nr. 7.

Reagensgläser mit je 10 Cm^3 Nährlösung: 1 % Kaliumnitrit (KNO_2), 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Kulturflüssigkeit und Gläser wurden vor dem Zusatz der Nährstoffe bei 130° sterilisiert, danach nur einmal auf 60° C. erhitzt und kontrolliert bakterienfrei.

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Nessler
M. Mucedo	o	o—×
M. sphaerosporus	×××	×
M. Christianiensis	×××	××
M. racemosus	×××	××
M. griseo-cyanus	×××	××
M. dispersus	×	×
M. genevensis	×××	××
M. circinelloides	×××	×
M. spinosus	×××	×
Zyg. Moelleri	o—×	o—×
Kontrolle (Ohne Infektion) I		o—×
Kontrolle (—»—) II		o—×

Versuch Nr. 8.

Erlenmeyerkolben mit Nährlösung: 1 % Kaliumnitrit (KNO_2), 1 % Glukose, gewöhnl. Salzlösung + 0,08 % Zitronensäure.[1]

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Alkalität der Kulturflüssigkeit nach der Sterilisierung aber vor der Infektion: 2,5 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$ pr. 10 Cm^3 Nährlösung. (Indikator Kongorot). Reaktion mit Nessler o—×.

	Nach 6-tägiger Kulturdauer			Nach 12-tägiger Kulturdauer		
	Wachstum	Nessler	Alkalität	Wachstum	Nessler	Alkalität
M. Christianiensis	×××	o—×	0,5 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$	×××	×—××	6,7 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$
M. racemosus	×××	o—×	1,0 —»—	×××	×—××	4,8 —»—
M. sphaerosporus	×××	o—×		×××	×	3,4 —»—
M. spinosus	×××	o—×	0,9 —»—	×××	×—××	4,3 —»—
M. genevensis	××	×		××	×—××	1,3 —»—
M. dispersus	×	×		×	o—×	1,5 —»—

[1] Die Zitronensäure wurde zugesetzt, teils um die kleinen Niederschläge der Flüssigkeit zu lösen, teils um die ursprünglich zu hoher alkalischen Reaktion (8,5 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$ pro 10 Cm^3 Nährlösung) etwas herabzusetzen.

Wie es aus dem letzten Versuche hervorgeht, ist die anfangs alkalische Reaktion, die 2,5 Cm³ $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 entsprach, in den ersten Tagen des Versuches herabgegangen, wie tief, kann nicht gesehen werden. Nach 6-tägiger Kulturdauer schwankt die Alkalität zwischen 0,5 und 1,0 Cm³ $\frac{n}{50}$ H_2SO_4. Im Laufe der weiteren Entwickelung steigt sie aber und beträgt nach 12 Tagen in Maximum 6,7 Cm³ $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm³ Nährlösung. Wie es in einem späteren Abschnitt über Säurebildung behandelt werden soll, stimmen diese Tatsachen gut mit meinen gewöhnlichen Erfahrungen, wonach in Kulturen mit Traubenzucker und Nitrat oder Nitrit in den ersten Tagen nicht unbedeutende Mengen einer organischen Säure produziert werden, die aber im Laufe der weiteren Entwickelung durch die aus der Stickstoffverbindung freiwerdenden Kationen neutralisiert werden, wonach die weiter freiwerdenden Kationen (als K(OH)) die Reaktion stark alkalisch machen.

Was nun die Bildung von Ammoniak in den Nitritkulturen betrifft, so geht ohne weiteres aus den Versuchen hervor, dass diese gewöhnlich keine unbedeutende ist.

In dem ersteren der zwei hier angeführten Versuche (Nr. 7) ist nach 10-tägiger Kulturdauer eine recht bedeutende Ammoniakmenge nachweisbar und zwar bei allen gut gedeihenden Arten, während sowohl bei den nicht wachsenden *M. Mucedo* und *Zyg. Moelleri,* als in den zwei nicht infizierten Kontrollgläsern die Ammoniakreaktion beinahe negativ ausfällt.

In dem letzteren dieser Versuche (Nr. 8) ist nach sechs Tagen bei den vier ersten Arten keine oder eine höchst unbedeutende Ammoniakmenge in der Kulturflüssigkeit nachweisbar, eine nicht unbedeutende dagegen für die zwei letzten Arten. Nach zwölf Tagen lässt sich aber Ammoniak in sämtlichen Kulturen nachweisen und zwar in bedeutenden Mengen. (Die für die Reaktion mit Nessler verwendeten Zeichen bedeuten in diesen zwei Versuchen: 0—× = nur schwache allmählig eintretende Gelbfärbung, × = augenblickliche, deutliche Gelbfärbung, ×—×× = augenblickliche, sehr starke Gelbfärbung, jedoch nur mit Spuren von Fällung, ×× = augenblickliche, ziemlich starke Fällung).

Es sind nun diese Versuche (Nr. 1—8) ohne Unterschied meinen Journalen entnommen. Was die Kulturen mit Nitraten betreffen, so zeigen sie also ein mehr oder weniger starkes Auftreten von Nitrit und Ammoniak, und in den Nitritkulturen sind immer variirende Mengen von Ammoniak nachweisbar. Es fragt sich nun, welche Bedeutung diesem Auftreten von Nitrit und Ammoniak zugeschrieben werden darf. Die nachweisbaren Mengen von diesen zwei Verbindungen sind gewöhnlich ziemlich klein. So ist z. B. in einem Versuche auf Kaliumnitrat die nach 14 Tagen vorhandene Nitritmenge durch kolorimetrische

Vergleichung annähernd zu 0,5 Mgr. KNO_2 auf 50 Cm^3 Nährlösung bestimmt, während sie in anderen Versuchen das 10- bis 50-fache beträgt, — jedoch aber immer sehr kleine Mengen. Auch die auftretenden Ammoniakmengen sind verhältnismässig klein und geben häufig mit Nesslers Reagens nur Gelbfärbung oder wenig Niederschlag, jedoch auch in mehreren Kulturen bedeutende Fällung von braunroten Massen.

Es darf nun bemerkt werden, dass weder der Nitrit noch das Ammoniak von der Verunreinigung der Laboratoriumsluft stammen. Natürlich können die äusserst kleinen Nitritmengen, die in der Luft eines mit Gas beleuchteten Laboratoriums immer zugegen sind, von der Nährlösung in kleinen Mengen absorbiert werden, und tatsächlich zeigt auch das Griess'sche Reagens, dass immer dies der Fall ist, indem selbst die Kontrollkulturen ohne Infektion eine schwache erst im Laufe mehrerer Minuten eintretende Rotfärbung zeigen, eine Reaktionsstärke, die in meinen Versuchen mit dem Zeichen o—╳ bezeichnet ist. Die bei den Kontrollkulturen erhaltene Nitritreaktion ist aber immer höchst unbedeutend und steht der in den wirklichen Kulturen auftretenden Reaktion bedeutend nach. Dies geht ja auch von dem Versuche Nr. 4 besonders schön hervor wo in der Serie C mit Mannit die Reaktion mit Griess in den fünf nicht gedeihenden Kulturen als o—╳ bezeichnet wird, also höchst unbedeutend ist, während sie bei den zwei einzig gedeihenden Arten *M. Christianiensis* und *M. spinosus* sehr stark (╳╳╳╳) ausfällt.

Dass die Rotfärbung mit Griess nicht von eventuell gebildeten Oxydasen oder anderen Enzymen bewirkt wird, ist in den meisten Versuchen durch vorausgegangenes Aufkochen der zu prüfenden Flüssigkeit bewiesen, wobei die Rotfärbung trotzdem eintrat.

Auch die auftretenden Ammoniakmengen sind immer bedeutend grösser, als die, die aus der Laboratoriumsluft absorbiert worden sind, wie es aus mehreren Kontrollversuchen hervorgeht und wie es auch z. B. Versuch Nr. 7 auf die schönste Weise zeigt.

Es muss daher angenommen werden, dass die auftretenden Ammoniak- und Nitritmengen von irgend einem Prozess, der an dem Leben und Wachstum der Pilze gebunden ist, herrühren, und es kommt mir vor, dass wir hier vor allem an eine Reduktion der Nitrate und Nitrite denken müssen.

Gehen wir nämlich schon im Voraus davon aus, dass die Nitrat- und Nitritassimilation ein Prozess ist, deren ersten Stufen eine Reduktion dieser Verbindungen zu Ammoniak sind, dann können wir wohl mit Sicherheit annehmen, es findet diese Reduktion nur innerhalb der Pilzzellen, also im Protoplasma, und nie in der Kulturflüssigkeit statt.

Dass im Mycelium dieser Pilze wahrscheinlich eine ganz energische Reduktion der Nitrate vorgeht, scheinen einige meiner Versuche zu zeigen, wobei das Mycelium von *M. spinosus*, auf Nitrat gewachsen, mit Kieselsand zerrieben und darauf unter Thymolzusatz mit Wasser ausgezogen wurde. Der wässerige Auszug hat dabei immer eine starke Reaktion auf Ammoniak gezeigt, aber was noch wichtiger ist, die Nitritreaktion ist immer positiv und zwar stark ausgefallen. In einem Versuche mit *M. spinosus* hat der wässerige Auszug von dem jungen kräftig wachsenden Mycelium sogar mit der Jodkalium-Stärke-Probe eine augenblicklich eintretende tiefblaue Farbe gegeben.

Wenn nun aber im Protoplasma des Pilzes eine Reduktion der Nitrate stattfindet, so ist es auch wahrscheinlich, das der Pilz hier auf eine ökonomische Weise arbeitet und nicht viel grössere Mengen dieser Verbindung reduziert, als für den Aufbau der Eiweisstoffe zu jeder Zeit nötig ist, und da auch die schnell wachsenden Mucorineen bei günstiger Kohlenstoffzufuhr das entstehende Ammoniak sehr schnell weiter verarbeiten, so können wir nur erwarten, dass sowohl von Nitriten wie Ammoniak verhältnismässig sehr kleine Mengen Gelegenheit finden in die Kulturflüssigkeit zu herausdiffundieren.

Eben diese kleinen herausdiffundierten Mengen aber, meine ich, sind durch meine Versuche nachgewiesen worden und rechtfertigen daher die Annahme, dass die Nitratassimilation durch eine Reduktion der Nitrate über Nitrite bis auf Ammoniak stattfindet.

Natürlich ist ein exakter Beweis hier schwer zu geben, und auch können Einwendungen mehrerlei Art gemacht werden; z. B. wäre es ja möglich, dass das auftretende Ammoniak nur von einem Abbau des Protoplasma der Zellen herrührt. Dagegen lässt sich aber wieder einwenden, dass die Ammoniakmengen selbst in jungen Kulturen häufig obwohl nicht immer so gross sind, dass sie von einem Protoplasmaabbau[1] gar nicht stammen können, und endlich macht auch das gleichzeitige Auftreten von Nitrit eine derartige Annahme relativ wenig wahrscheinlich.

Es wäre nun von Interesse die eigentliche Ursache der Nicht-Nitratassimilation der zahlreichen Mucorineen etwas näher kennen zu lernen. Vor allem konnte man, wie schon Laurent (1889) für die Hefe, daran denken, dass die intermediär entstehenden Nitrite für die Pilze dermassen giftig seien, dass sie jede Entwickelung hemmen. Um Klarheit hierüber zu erlangen, habe ich einen Versuch angestellt, bei dem Pepton und

[1] Eine Veratmung oder Abbau des pflanzlichen Protoplasmas ist ja auch sehr zweifelhaft und gehört allenfalls zu den viel umstrittenen Fragen.

Glukose den Pilzen als Nahrung geboten wurden, während gleichzeitig den Kulturen verschiedene Mengen Kaliumnitrit zugesetzt waren. Es mag vielleicht von Interesse sein, diesen Versuch etwas näher zu besprechen.

Versuch Nr. 9.

Reagensgläser mit Nährlösung: 1 % Pepton, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

3. Serien: Serie A — Ohne Zusatzt von Kaliumnitrit.
Serie B — Mit — » 0,1 % Kaliumnitrit.
Serie C — » — » 1 % —»—

Temperatur 21° C. Ohne Lichtzutritt.

Die Kulturen wurden schon nach 3 und 5 Tagen mit folgendem Resultat untersucht:

	Überall 1 % Pepton + 1 % Glukose				
	A 0—KNO_2 Wachstum nach 3 Tagen	B 0,1 % KNO_2 Wachstum nach 3 Tagen		C 1 % KNO_2 Wachstum nach 3 Tagen	
M. racemosus	XXX	XX	Nach 5 Tagen zeigten alle 6 Arten das Wachstum XX	X—XX	Nach 5 Tagen zeigten alle 6 Arten das Wachstum XX
M. flavus	XXX	X—XX		X—XX	
M. hiemalis	XXX	X—XX		X	
M. spinosus	XXX	XX		X—XX	
M. silvaticus	XXX	XX		XX	
Abs. glauca	XXX	XX		XX	

Betrachten wir hier zuerst das Resultat nach 3 Tagen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist das Wachstum in Serie A — ohne Nitritzusatz sehr gut. In Serie B mit 0,1 % Nitrit spüren wir aber sobald einen hemmenden Einfluss dieses Salzes. Das Wachstum ist für *M. hiemalis* und *M. flavus* bedeutend herabgedrückt und für die vier anderen Arten ist auch die Entwickelung bei weitem nicht so gut wie in Serie A. Ein Zusatz endlich von 1 % Nitrit in Serie C hat die Entwickelung für *M. racemosus, M. flavus, M. hiemalis* und *M. spinosus* sehr hemmend beeinflusst, während *M. silvaticus* und *Abs. glauca* noch ziemlich gut gedeihen.

Im Laufe der weiteren Entwickelung verschiebt sich aber das Verhältnis etwas zu Gunsten der zwei letzten Serien. Schon nach 5 Tagen habe ich für alle 6 Arten in den beiden Nitritserien B und C das Wachstum XX notiert, und in der späteren Entwickelung verschwindet der Unterschied zwischen den Nitritserien und der Serie A ohne Nitrit mehr und mehr, — obwohl nicht ganz vollständig.

Mit Rücksicht auf die Schädlichkeit der Nitrite zeigt nun dieser Versuch folgendes:

Die Nitrite scheinen schon in einer Konzentration von 0,1 % die Keimung der Sporen und die Entwickelung der jungen Kulturen etwas zu hemmen. In grösseren Konzentrationen, wie 1 %, ist der schädliche Einfluss ziemlich bedeutend. Es wirken aber die Nitrite hierbei auf die nitrat- und nitritassimilierenden Pilze wie *M. racemosus* und *M. spinosus* ebenso schädlich wie auf die Arten, die eine solche Assimilationsfähigkeit nicht zukommen, in diesem Versuche also *M. hiemalis*, *M. flavus*, *M. silvaticus* und *Abs. glauca*. Sämtliche versuchte Pilze vermögen aber diese hemmende Einwirkung der Nitrite zu überwinden und weiter zu wachsen. Mit steigendem Alter der Kulturen verschwindet fast jede sichtbare Hemmung.

Man wird daher wohl folgern können, dass die Mangel an der Fähigkeit, Nitrate und Nitrite zu assimilieren, allenfalls bei den Mucorineen nicht durch die Schädlichkeit der Nitrite, weder für die Keimung noch für die weitere Entwickelung des Pilzes zu suchen ist.

Meiner Meinung nach können wir diese Unfähigkeit zahlreicher Mucorineen die hochoxydierten Stickstoffverbindungen wie Nitrate und Nitrite zu assimilieren nur dadurch erklären, dass das Protoplasma dieser Pilze nicht im Stande ist, diese Verbindungen zu reduzieren und dadurch die Gruppe NH_2 zu formieren, die wahrscheinlich der Ausgangspunkt der Eiweisssyntese aus den anorganischen Verbindungen ist. Diese Fähigkeit muss dagegen das Protoplasma der nitrat- und nitritassimilierenden Pilze besitzen. Sie können, durch Enzyme oder wie sonst, die Nitrate über Nitrite zu Ammoniak reduzieren, und bilden wahrscheinlich aus diesem die für die Eiweisssyntese nötige NH_2-Gruppe.

2. Ammoniumsalze.

Ammoniak in der Form eines Ammoniumsalzes bietet gewöhnlich für die meisten Pilze eine sehr gute Stickstoffquelle. Durch die neueren Untersuchungen besonders von NIKITINSKY (1904) und BUTKEWITSCH (1903) ist aber bewiesen, dass der Nährwert der Ammoniumsalze in hohem Grade von der Art ihrer Säure-Anionen abhängig ist. Dies gielt besonders für die Ammoniumsalze der anorganischen Säuren wie $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl und NH_4NO_3. Je nachdem der Pilz hier das Kation (NH_4) verarbeitet, werden die Säure-Anionen frei, und es findet eine Anhäufung freier Säure statt,

die bei diesen sehr stark dissozierten Säuren sehr schnell zu einer schädlichen H-Ionen-Konzentration führt.

Dies trifft für die allermeisten meiner Mucorineen in hohem Grade zu. In Nährlösungen, die Glukose, anorganisches Ammoniumsalz und gewöhnl. Nährsalze enthalten, wird die Entwickelung sehr schnell gehemmt, und es kommt zur Bildung des typischen »Säuremyzels« mit dicken, häufig fast verschleimten Wänden und kurzen aber dicken Ästen und Zweigen. Das weitere Wachstum hört darauf ziemlich schnell auf. Diese typische Säurehemmung habe ich besonders bei Ammoniumnitrat und Ammoniumsulfat beobachtet, während ich das Ammoniumklorid noch nicht geprüft habe. Das Ammoniumphosphat dagegen erlaubt den Pilzen eine weit bessere Entwickelung und ist häufig eine sehr gute Stickstoffquelle. Dies wird wohl teils dadurch erklärt, dass hier das Säure-Ion PO_4 allenfalls zu einem kleineren Teil verbraucht wird, teils aber auch durch die weit geringere Dissoziation der Phosphorsäure.

Durch allmähliche Neutralisation der gebildeten Säure, was sich durch Kalziumkarbonat sehr bequem ausführen lässt, werden nun für die anorganischen Ammoniumsalze die hemmenden Einwirkungen vollständig aufgehoben, wie schon NIKITINSKY gezeigt hat. Für meine Mucorineen hat sich dies auch bestätigt. Ich habe in Glukose-Ammoniumsulfatlösungen, denen $CaCO_3$ zugesetzt war, eine ganze Reihe von Mucorineen züchten können, und sie haben hier vollständig normale Entwickelung mit reichlicher Fruktifikation gezeigt.

Die salpetersauren Ammoniumsalze verhalten sich übrigens bei denjenigen Pilzen, die die Salpetersäure auch angreifen können, natürlich etwas anders. Bei *M. spinosus* und *M. racemosus* z. B. wird sowohl das Kation NH_4 als das Anion NO_3 verarbeitet, und es kommt daher nicht zu einer Säureanhäufung. Für die nitratreduzierenden Pilze (siehe das vorige Kapitel) bietet daher das Ammoniumnitrat eine besonders gute Stickstoffquelle. Als Beispiel mag hier nur der folgende Versuch angeführt werden.

Versuch Nr. 10.

Reagensgläser mit je ca. 7 Cm^3 Nährlösung: 1 % Glukose, gewöhnl. Salze und dazu entweder 1 % $(NH_4)NO_3$ oder 1 % $(NH_4)_2SO_4$.

Die Alkalität betrug vor dem Versuche 0,25 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung.

Temperatur 20—22° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 3 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum		Azidität oder Alkalität pro 10 Cm^3 Nährlösung	
	1 % NH_4NO_3	1 % $(NH_4)_2SO_4$	1 % $(NH_4)NO_3$	1 % $(NH_4)_2SO_4$
M. racemosus	×××	×–××	0,4 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$	5,0 $Cm^3 \frac{n}{50} Ba(OH)_2$
M. spinosus	×××	×–××	0,3 —»—	4,2 —»—
M. hiemalis	×	×–××	2,5 $Cm^3 \frac{n}{50} Ba(OH)_2$	4,6 —»—

Aus dieser Tabelle ist mit einem Mal zu sehen, welche grosse Rolle die gebildete Säure in der Entwickelung der Pilze spielt. Die zwei ersten Arten, *M. racemosus* und *M. spinosus* können KNO_3 angreifen und verarbeiten daher hier aus NH_4NO_3 sowohl das NH_4 wie das NO_3 und zwar augenscheinlich mit derselben Schnelligkeit; denn die Reaktion der Nährlösung ist fast unverändert geblieben. Es haben sich also weder NH_4-Ionen noch NO_3-Ionen angehäuft. Jeder schädlichen Säurewirkung ist dadurch entgangen, und beide Pilze zeigen gutes Wachstum (×××). *M. hiemalis* dagegen, der zu den nicht KNO_3-reduzierenden Arten gehört, verarbeitet nur das NH_4-Ion und lässt das NO_3-Ion intakt bleiben. Dadurch häuft sich die Salpetersäure an und übt ihre schädlichen Wirkungen auf das Wachstum aus. In der Serie mit $(NH_4)_2SO_4$ wird nun natürlich das SO_4-Anion nicht verarbeitet, die freie Schwefelsäure wird daher angehäuft und setzt das Wachstum auf ×–×× herab.

Dass die Alkalitätszahlen für *M. hiemalis* in der Reihe mit $(NH_4)_2SO_4$ ungefähr doppelt so gross sind wie mit NH_4NO_3, stimmt mit den Beobachtungen von Butkewitsch gut überein. Nach diesen steht nämlich die Ammoniakmenge, die ein Pilz in einer bestimmten Zeit von einem bestimmten Ammoniumsalz verarbeiten kann, in dem umgekehrten Verhältnis zu der Affinität des betreffenden Säure-Ions zum Ammonium-Ion. Da nun eben die Affinität der Salpetersäure zu NH_4 fast genau doppelt so gross ist (genau $\frac{100}{53}$) wie die Affinität der Schwefelsäure zu NH_4, so muss umgekehrt die Verarbeitung von Ammoniak aus $(NH_4)_2SO_4$ doppelt so schnell wie aus $(NH_4)NO_3$ vorsichgehen. Damit stimmen auch auf die schönste Weise die im obigen Versuche gefundenen Alkalitätszahlen für *M. hiemalis,* nämlich 2,5 $Cm^3 \frac{n}{50} Ba(OH)_2$ bei NH_4NO_3 und 4,6 $Cm^3 \frac{n}{50} Ba(OH)_2$ bei $(NH_4)_2SO_4$, die also im Verhältnis $\frac{100}{54}$ stehen. Danach ist also im letzen Falle doppelt so viel Wasserstoff-Ionen zugegen als im ersteren, also ist auch doppelt so viel NH_4 verarbeitet.

Auch bei den zwei anderen Arten hatten wohl die Zahlen dasselbe Ergebnis gezeigt, wenn nicht hier zugleich die NO_3-Ionen verarbeitet wurden.

Aus der folgenden Tabelle des Versuches Nr. 11 lassen sich mit Rücksicht auf den Nährwert der Ammoniumsalze und Nitrate oder Nitrite auch Tatsachen schliessen.

Versuch Nr. 11.

Erlenmeyerkolben (2 Liter) mit je 200 Cm^3 Nährlösung: 2 % Traubenzucker, gewöhnl. Salzlösung und dazu in vier Serien Stickstoffequivalente Mengen von den folgenden Salzen: I KNO_2 (1,7 Gr.), II KNO_3 (2,0 Gr.), III NH_4NO_3 (0,8 Gr.), IIII $(NH_4)_2(COO)_2$ (1,2 Gr.), jeder von ihnen ein Stickstoffgehalt pro Kolbe von 0,276 Gr. N entsprechend.

Temperatur 17—22° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach einer Kulturdauer von einem Monate wurde gefunden:

		Gewicht des bei gewöhnlicher Temperatur luftgetrochneten Myzels.		
		M. racemosus	*M. spinosus*	*M. hiemalis*
2 % Glukose +	1,7 Gr. KNO_2	328 Mgr.	620 Mgr.	nichts
	2,0 » KNO_3	380 »	510 »	nichts
	0,8 » $(NH_4)NO_3$	438 »	882 »	165 Mgr.
	1,2 » $(NH_4)_2(COO)_2$	227 »	237 »	275 »

	Alkalität oder Azidität pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen			
	Vor dem Versuche	Nach dem Versuche		
	Bei sämtlichen Arten	*M. racemosus*	*M. spinosus*	*M. hiemalis*
2 % Glukose + KNO_2	6,8 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	8,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	9,2 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	unverändert
KNO_3	0,25 » » —	6,0 » » —	3,8 » » —	unverändert
NH_4NO_3	0,25 » » —	3,1 » » —	0,25 » » —	6,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$
$(NH_4)_2(COO)_2$	0,5 » » —	6,0 » » $Ba(OH)_2$	1,7 » » $Ba(OH)_2$	4,8 » » —

In sämtlichen diesen Kulturen steht nun den Pilzen genau dieselbe Stickstoffmenge zur Verfügung, die Erntegewichte sind aber sehr verschieden. Für *M. racemosus* und *M. spinosus* ist die Ernte bei NH_4NO_3-Darbietung die grösste, dann folgen die Kulturen mit KNO_3 und KNO_2 und zuletzt das Ammoniumoxalat mit seiner ziemlich kleinen Ernte. Sehr auffallend ist die grosse Ernte bei *M. spinosus* mit KNO_2; sie übersteigt bedeutend die Nitratkultur während bei *M. racemosus* das umgekehrte der Fall ist, indem hier die Nitratkultur eine grössere Ernte als die Nitritkultur giebt.

Bei *M. hiemalis* ist nun mit KNO_2 oder KNO_3 keine Entwickelung zu beobachten, und auch mit NH_4NO_3 ist die Ernte sehr niedrig. Dies hängt offenbar mit einer ziemlich energischen Säurebildung zusammen. Denn während bei *M. spinosus* das NH_4-Ion und das NO_3-Ion ungefähr in gleich starkem Grade verbraucht wird und die Lösung also ihre ungefähr neutrale Reaktion unverändert beibehalten hat, so ist bei *M. hiemalis* nur das NH_4-Ion verarbeitet und die Nährlösung zeigt eine stark saure Reaktion von 6,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Nährlösung. Eine so hohe Azidität, besonders wenn sie durch die stark dissozierte Salpetersäure

bewirkt wird, ist für die Entwickelung des Pilzes natürlich absolut hemmend, und die *M. hiemalis*-Kultur zeigt dann ein relativ kümmerliches Aussehen mit typischem Säure-Myzelium.

Ammoniumoxalat hat, wie die Tabelle zeigt, im Verhältnis zu Ammoniumnitrat nur einen mittleren Nährwert. Ob auch hier die entstehende Oxalsäure als Säure entwickelungshemmend wirkt, ist nicht leicht zu entscheiden; dies ist aber im Voraus nicht sehr wahrscheinlich, da ihre Dissoziation den organischen Säuren weit zurück steht.

Mit Rücksicht auf die Verwendbarkeit der Ammoniumsalze der organischen Säuren finden sich übrigens mehrere widersprechende Beobachtungen. CZAPEK hat (1902[a]) darauf hingewiesen, dass die Ammoniumsalze der Fettsäurereihe für *Aspergillus* ganz untauglich sind, was er durch ihre geringe elektrolytische Dissoziation zu erklären sucht. Dies wird dann wieder von BENECKE (LAFAR: Handbuch p. 404) als nicht zutreffend angesehen. Für die Ammoniumsalze der Oxysäuren dagegen findet CZAPEK, dass sie eine vortreffliche Stickstoffnahrung darbieten.

Versuche mit fettsauren Ammoniumsalzen habe ich nun nicht vorgenommen, aber für die Ammoniumsalze der Oxysäuren kann ich die Resultate CZAPEKS bestätigen. Besonders das monooxybernsteinsaure (äpfelsaure) Ammoniak ist eine äusserst gute Stickstoffquelle, und eine ganze Reihe von meinen Erdboden-Mucorineen kommen mit dieser Verbindung als einzige N-Quelle sehr gut aus. Es darf nur hier ein einziger Versuch erwähnt werden.

Versuch Nr. 12.

Petrischalen mit Nähragar: 1 % äpfelsaures Ammonium, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur 21° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10 Tagen zeigten sämtliche geprüften Arten sehr gute Entwickelung und reichliche Fruktifikation. Es waren die folgenden:

M. Mucedo	*M. griseo-cyanus*
M. strictus	*M. genevensis*
M. saturninus	*M. silvaticus*
M. flavus	*M. spinosus*
M. piriformis	*M. stolonifer*
M. racemosus	*M. arrhizus*
M. Christianiensis	*M. nodosus*
M. sphaerosporus	*Abs. Orchidis*
M. dispersus	*Abs. cylindrospora*
M. hiemalis	*Thamn. elegans.*

Sämtliche diese Arten mit Ausnahme von *M. arrhizus* sind auch in Ammoniumsulfat-Glukose-Lösungen mit Zusatz von Calciumkarbonat gezüchtet worden und haben auch hier nach 8 Tagen sehr schöne und kräftige Entwickelung gezeigt. Sie kommen also alle mit Ammoniumsalze als einzige N-Quelle sehr gut heraus.

3. Harnstoff.

Der Harnstoff, das Diamid der Kohlensäure, $CO\langle^{NH_2}_{NH_2}$, wird wie bekannt durch eine Reihe von aeroben Bakterien enzymatisch zerlegt und zwar unter Bildung von Ammoniumkarbonat, ein Prozess, der unter den Namen die bakterielle Harnstoffspaltung schon ziemlich gut bekannt ist und auf welchen hier daher nicht eingegangen wird.

Das Verhalten der Pilze dem Harnstoff gegenüber ist nun wahrscheinlich ein etwas verschiedenes. In der Literatur findet sich, soweit mir bekannt, relativ wenige Angaben.

Schon Diakonow (1887, p. 380) giebt an, dass *Penicillium* selbst mit Harnstoff als einzigem, organischen Bestandteil des Substrates etwas zu wachsen vermag, und dass ferner mit der Harnstoffverarbeitung Hand in Hand eine intensive Bildung von Ammoniak oder Ammoniumkarbonat geht.

Czapek (1901—1902) findet, dass *Aspergillus niger* den Harnstoff bei Zuckerzusatz wohl verarbeitet, jedoch nimmt, wie er sagt, diese einfachste Aminosäure als N-Quelle nur einen mittleren Wert ein. Über die chemische Seite der Harnstoffverarbeitung, die entstandenen Produkte u. s. w., sagt er nichts.

Jedoch ist es eine bekannte Tatsache, dass mehrere Pilze mit dem Harnstoff als einziger N-Quelle ziemlich gut herauskommen, obwohl Czapek (Biochemie der Pflanzen) darauf aufmerksam gemacht, dass sich hier die verschiedenen Pilze nicht gleich verhalten, und dass die pilzliche Harnstoffspaltung überhaupt noch wenig bekannt ist.

Bei meinen Untersuchungen war es mir nun darum zu tun, zuerst die Bedeutung des Harnstoffes als N-Quelle für Erdboden-Mucorineen zu untersuchen, dann aber auch die Endprodukte seiner Spaltung etwas näher zu studieren.

In einem orientierenden Versuche wurde zuerst eine Reihe von Mucorineen auf Harnstoff-Glukose-Agar in Petrischalen gezüchtet. Schon nach 5 Tagen zeigten fast sämtliche Arten gute Entwickelung und reiche Fruktifikation. Es waren die folgenden:

Mucor Mucedo	*Mucor silvaticus*
— *strictus*	— *circinelloides*
— *piriformis*	— *genevensis*
— *flavus*	— *stolonifer*
— *hiemalis*	— *arrhizus*
— *spinosus*	— *nodosus*
— *dispersus*	*Abs. Orchidis*
— *saturninus*	— *glauca*
— *griseo-cyanus*	— *cylindrospora.*

Also im Ganzen 18 Arten, die mit Harnstoff als N-Quelle gut herauskommen können.

Nur eine einzige Art, *Mucor Ramannianus* konnte auf Harnstoff-Glukose-Agar nicht gedeihen und zeigte nach 8 Tagen nur äusserst schlechte Entwickelung.

Unter den gut gedeihenden Arten zeichneten sich mehrere Kulturen durch einen intensiven Ammoniakgeruch aus. Es waren dies vor allem die drei Arten:

M. racemosus und *M. spinosus*
M. flavus.

Nach diesem vorläufigen Resultat schien es von Interesse zu sein, die Ammoniakbildung etwas näher zu studieren, und es wurden daher mehrere Kulturversuche ausgeführt, wobei die Pilze in Harnstoff-Glukose-Lösungen in Erlenmeyerkolben gezüchtet wurden. Um bei diesen Versuche jeder bakteriellen Verunreinigung zu entgehen, wurde sowohl die Erlenmeyerkolben wie das für die Nährlösung zu verwendende Wasser bei 130° C. äusserst sorgfältig sterilisiert und dann erst die verschiedenen Verbindungen (Harnstoff, Glukose, Nährsalze) zugewogen und die Lösung auf den Erlenmeyerkolben gegossen. In diesen wurde sie dann wieder durch zweimaliges kurzes Erhitzen auf 100° C. endlich sterilisiert. Der Harnstoff wird durch dieses, nur wenige Minuten dauerndes Erhitzen auf 100° nur äusserst wenig gespaltet und eine Verunreinigung durch Bakterien trat mit diesen Vorsichtsmassregeln nur in vereinzelten Kolben auf, natürlich dann von Infektion beim Einbringen der Pilzsporen herührend. Nach Beendigung des Versuches wurde für jeden Kolben mikroskopisch die Reinheit der Nährflüssigkeit kontrolliert.

Ich habe nun hier mehrere Versuche angestellt. Sie stimmen untereinander aber so gut überein, dass ich hier nur die folgende Tabelle gebe, in welcher die Resultate zweier Versuche zusammengestellt sind. Diese zwei Versuche waren zu verschiedener Zeit zur Ausführung gekommen,

jedoch aber unter völlig gleichwertigen Versuchsbedingungen und stimmen mit Rücksicht auf Wachstum, Karbonat-, Ammoniak- und Oxalsäure-Reaktion völlig überein, nur die Zahlen für die Alkalität der Nährflüssigkeit weichen von einander unbedeutend ab. In dieser Tabelle ist das Mittel der zwei Versuche aufgeführt.

Versuch Nr. 13.

Erlenmeyerkolben mit je 50 Cm^3 Nährlösung: 1 % Harnstoff, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Die Alkalität betrug vor der Infektion 0,6 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung (Indikator: Kongorot). Reaktion mit Nessler o—× (ↄ: schwache Gelbfärbung).

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Wachstum	Fruktifikation	Zur Neutralisation pro 10 Cm^3 Nährlösung nötige Menge $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	Karbonatreaktion[1] (mit kochendem Kalkwasser)	Oxalsäure (mit Ca-Acetat und Essigsäure)	Nessler
M. Mucedo	×××	×	22,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	×××	o	×××
M. strictus	×××	××	13,7 —»—	»[1]	o	×××
M. saturninus	×××	××	28,9 —»—	»	o	×××
M. flavus	×××	×××	39,2 —»—	×××	o	×××
M. sphaerosporus	××	o	46,5 —»—	»	o	×××
M. racemosus	×××	o	46,0 —»—	×××		×××
M. Christianiensis	×××	o	53,0 —»—	×××		×××
M. dispersus	××	o	10,2 —»—	»		×××
M. genevensis	×××	××	7,0 —»—	»		××
M. hiemalis	×××	×××	30,0 —»—	×××	o	×××
M. griseo-cyanus	××	××	33,0 —»—	»	o	×××
M. silvaticus	××	××	30,2 —»—	×××	o	×××
M. spinosus	××	×	38,4 —»—	×××	o	×××
M. circinelloides	××	××	29,0 —»—	»	o	×××
M. stolonifer	×××	×	22,0 —»—	×××	o	×××
M. nodosus	×××	×××	2,0 —»—	»	o	×
Abs. Orchidis	×××	×××	8,0 —»—	»	×××	×××
Abs. glauca	×××	×××	3,0 —»—	»	×××	×××
Abs. cylindrospora	×××	×××	13,0 —»—	××	×	×××
Abs. spinosa	×	o	19,0 —»—	××	o—×	×××
Zyg. Moelleri	×××	××	21,0 —»—	×××	o	×××

[1] Die Karbonatreaktion ist bei den nur mit » aufgeführten Arten nicht ausgeführt. Karbonat wird natürlich auch hier gebildet.

Mit einer einzigen Ausnahme (*Abs. spinosa*) zeigen also die geprüften Arten ein ziemlich gutes bis sehr gutes Wachstum, was ohne weiteres beweist, dass sie mit Harnstoff als N-Quelle gut herauskommen.

Dann zeigen aber die meisten Kulturen mit Nesslers Reagens eine Ammoniakreaktion, die bei vielen Arten eine sehr intensive ist, und nur bei *M. nodosus* ziemlich schwach ausfällt. Es wird also bei der Harnstoffverarbeitung Ammoniak abgespaltet, und zwar zeigt die grosse Alkalität der Nährflüssigkeit, dass die Ammoniakabspaltung allenfalls bei mehreren Arten eine sehr grosse ist. So ist z. B. bei *M. Christianiensis* eine Ammoniakmenge vorhanden, die pro 10 Cm^3 Nährflüssigkeit nicht weniger als 53,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 zur Neutralisation verbraucht.

Endlich lässt sich in sämtlichen Kulturen Kohlensäure nachweisen, auf der bekannten Weise durch Eintröpfen der Kulturflüssigkeit in siedendes Kalkwasser, wobei sich in den meisten Kulturen alsbald grosse Wolken von $CaCO_3$ gebilden. Bei *M. nodosus* wurde auf diese Weise nur eine leichte Trübung sichtbar.

Bei der Harnstoffverarbeitung wird also von den Mucorineen in verschiedenem hohen Grade Ammoniumkarbonat abgespalten. Die Bildung von Ammoniumkarbonat ist unter den *Mucor*-Arten besonders bei *M. Christianiensis, M. racemosus, M. sphaerosporus, M. flavus* und *M. spinosus* eine sehr starke (Alkalität 38—53 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung), bei einer Reihe anderer Arten dagegen eine mittlere (22—35 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4). Ziemlich kleine Mengen von Ammoniumkarbonat werden dagegen von *M. strictus, M. dispersus, M. genevensis* und besonders von *M. nodosus* gebildet. Bei dem letzten entspricht, trotz ausgezeichnetes Wachstums, die Alkalität der Nährflüssigkeit nur 2,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung.

Es wäre möglich, dass die geringe Alkalität bei *M. nodosus* einer bei dieser Art häufig beobachteten Säurebildung zuzuschrieben sei. Jedoch glaube ich, dass dies hier nicht der Fall ist, denn auch die Reaktion mit Nessler ist eine verhältnismässig sehr schwache, was darauf deutet, dass hier überhaupt wenig Ammoniak abgespaltet wird.

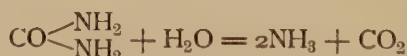
Von *M. nodosus* unterscheidet sich auch hier *M. stolonifer*, der in diesen Versuchen viel grössere Mengen Ammoniumkarbonat gebildet hat (Alkalität 22,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4).

Was nun die *Absidia*-Arten betrifft, so zeichnen sich diese durch eine relativ niedrige Alkalität der Nährflüssigkeit aus. Hierbei ist jedoch zu bemerken, dass bei diesen Arten die Alkalität der Nährflüssigkeit nicht ohne weiteres als Maasstab für die Ammoniakbildung genommen werden

darf, denn besonders *Abs. Orchidis* und *Abs. glauca* produzieren auch hier ziemlich viel Oxalsäure, durch welche natürlich entsprechende Mengen von Ammoniak neutralisiert werden. Eben bei diesen Arten ist daher die Kulturflüssigkeit nur schwach alkalisch, während ihre starke Reaktion mit Nessler jedoch eine bedeutende Ammoniakbildung beweist. Bei *Abs. cylindrospora* und besonders bei *Abs. spinosa*, wo nur unbedeutende Mengen Oxalsäure produziert werden, ist daher auch die Alkalität ziemlich hoch, und die Fällung mit Kalkwasser, die in den Kulturen von *Abs. Orchidis* und *Abs. glauca* als Ca-Oxalat ausfiel, zeigt hier eine ziemlich starke Karbonatreaktion, indem fast der ganze Niederschlag in verdünnter Essigsäure löslich ist und daher vorwiegend aus $CaCO_3$ und nicht aus Ca-Oxalat besteht.

Endlich zeigt nun der Versuch, dass die *Absidia*-Arten auch unter diesen Kulturbedingungen ziemlich viel Oxalsäure produzieren. Diese Oxalsäure hat wohl auch hier in einer unvollständigen Oxydation des Zuckers ihren Ursprung, allenfalls ist eine Enstehung aus dem Harnstoff oder dem Ammoniumkarbonat viel weniger wahrscheinlich.

Eine Umwandlung des Harnstoffes in Ammoniumkarbonat findet also durch sämtliche geprüfte Arten statt. Diese Bildung von Ammoniumkarbonat scheint aber bei den einzelnen Arten eine recht verschiedene Intensität zu haben. So ist z. B. in der Kultur von *M. Christianiensis* nach 10 Tagen zur Neutralisation 53 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung nötig, also für die ganze Menge der Kulturflüssigkeit, 50 Cm^3, nicht weniger als 265 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4. Nehmen wir an, dass die Harnstoffspaltung nach der Gleichung



$$CO\begin{matrix}\diagup NH_2 \\ \diagdown NH_2\end{matrix} + H_2O = 2NH_3 + CO_2$$

stattfindet, also dass aus jedem Molekül Harnstoff zwei Moleküle Ammoniak gebildet werden und ferner, dass die Schwefelsäure nur zur Neutralisation von Ammoniak gedient habe, so lässt sich daraus berechnen, dass in der Kulturflüssigkeit von *M. Christianiensis* eine Ammoniumkarbonatmenge zugegen ist, die 0,159 Gr. Harnstoff entspricht. Es ist also nicht weniger als 31,8 % des ursprünglich gebotenen Harnstoffes (0,5 Gr. pr. Kultur) als Ammoniumkarbonat vorhanden.

Hierzu kommt dann die wohl nicht unbedeutende Ammoniakmenge, die von dem Pilze absorbiert ist und für die Eiweisssyntese verwendet ist. Die Spaltung des Harnstoffes muss daher bei dieser Art eine sehr energische sein.

Bei *M. Christianiensis* hat nun die Spaltungsintensität ihren grössten Wert erreicht. Die kleinste Spaltung, findet sich bei *M. nodosus* wo,

auf dieselbe Weise berechnet, nach 10 Tagen nur 1,2 % des gebotenen Harnstoffes in der Nährlösung als Ammoniumkarbonat vorhanden ist.

Bei einer recht beträchtlichen Anzahl Arten, wohl ungefähr die Hälfte der geprüften, ist die Spaltungsintensität so stark, dass nach 10-tägiger Kulturdauer mehr als 15 % des gebotenen Harnstoffes als Ammoniumkarbonat vorhanden ist (Alkalität > als 25 Cm³ $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm³ Nährlösung).

Die Frage nach der Art der pilzlichen Harnstoffspaltung ist von bedeutendem Interesse. Wie bekannt ist durch BEJERINCKS Untersuchungen für die Bakterien festgestellt, dass die Harnstoffspaltung hier durch ein Enzym, eine Urease, bewirkt wird. Nach den spätesten Untersuchungen (BEIJERINCK — L. MOLL)[1] muss wohl diese Urease mit Sicherheit den intrazellulären Enzymen zugerechnet werden, indem sie nur innerhalb des Protoplasmaleibes zu wirken scheint.

Es fragt sich nun ob auch die Mucorineen die Harnstoffspaltung durch ein spezielles Enzym vollziehen. Dies ist schon im Voraus die einzige natürliche Annahme und zwar aus mehreren Ursachen.

Erstens hat nämlich SHIBATA (1904) mit einem Azetondauerpräparat von *Aspergillus niger*-Myzelium mehrere interessante Beobachtungen gemacht. Es gelang ihm mit seinem Azetonpräparat eine recht bedeutende Ammoniakabspaltung aus Harnstoff und mehreren Säureamiden zu bewirken, während andere Verbindungen wie Asparagin und Harnsäure nicht angegriffen wurden. Die Enzyme, die hierbei wirksam sind, nennt er vorläufig nur Amidasen, weil er ihre Identität mit der bakteriellen Urease nicht beweisen konnte.

Hierzu kommt nun die grosse Ähnlichkeit der pilzlichen Harnstoffspaltung mit der bakteriellen, besonders mit Rücksicht auf die in beiden Fällen gebildeten Verbindungen Ammoniak und Kohlensäure. Auch diese Tatsache spricht dafür, dass die pilzliche Harnstoffspaltung ebenso wie die bakterielle Harnstoffspaltung von enzymatischer Natur ist. Bewiesen werden kann diese Annahme natürlich nur durch Herstellung von Enzympräparaten aus den betreffenden Pilzmyzelien. Derartige Versuche habe ich leider nicht Gelegenheit gehabt auszuführen, und es muss daher hier nur als eine sehr wahrscheinliche obwohl nicht bewiesene Annahme angeführt werden, dass die pilzliche Harnstoffspaltung, wie sie z. B. von den Mucorineen bewirkt wird, auch von enzymatischer Natur ist.

Es mag nun zuletzt darauf kurz hingewiesen werden, dass eine 1 % Harnstoff-Glukose-Lösung durch das frei gewordene Ammoniumkarbonat

[1] Zitiert nach CZAPEK: Biochemie der Pflanzen Bd. II, S. 108.

so stark alkalisch wird, dass es die Entwickelung des Pilzes sehr ungünstig beeinflusst. Schon eine Alkalität, die 15 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$ pro 10 Cm^3 Nährlösung entspricht, wirkt schwach hemmend, und wenn sie mehr als 30 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$ beträgt scheinen allenfalls mehrere Arten ihr Wachstum völlig einzustellen.

Die Pilze bilden also hier durch ihre enzymatische Tätigkeit eine Verbindung (Ammoniumkarbonat), die zuletzt auf das Wachstum sehr stark hemmend einwirkt.

4. Azetamid.

Als Vertreter der Amide habe ich bei meinen Versuchen das einfachste Amid der Fettsäure-Reihe, das Azetamid, gewählt und zwar dies aus mehreren Gründen.

Erstens steht das Azetamid seiner Konstitution zufolge in naher Übereinstimmung mit dem Harnstoff, womit ich auch experimentierte:



Azetamid. Harnstoff.

Ein Vergleich zweier derart verwandtschaftlich konstituirten Verbindungen wäre von Interesse.

Zweitens ist nun das Azetamid als N-Quelle für Pilze mehrmals untersucht worden, und besonders CZAPEK (1902[a]) findet für *Aspergillus niger*, dass es als solches unter den übrigen Amiden der Fettsäuren eine recht besondere Stellung einnimmt, indem es als einzige N-Quelle ein Trockengewicht der Pilzernte giebt, das fast ebenso hoch ist wie mit Aminosäuren, die bekanntlich die beste Stickstoffnahrung darbieten.

Diese besondere Stellung des Azetamids als N-Quelle erklärt CZAPEK später (Biochemie der Pflanzen) durch die Annahme, dass es seiner Konstitution zufolge, $CH_3—CO—NH_2$, zu einer ähnlichen Verkettung geeignet ist, wie die, die nach HOFMEISTER und FISCHER bei der Polypeptidbildung (also der Vorstufe der Eiweisssyntese) zwischen den Aminosäureresten stattfindet.

Das gute Eignen des Azetamids als N-Quelle ist nun weiter (nach CZAPEK: Biochemie, zitiert) ausser von ihm bei *Aspergillus niger* auch von anderen für den Soorpilz und *Basidiobolus* konstatiert worden.

Bei meinen eignen Versuchen ist das Azetamid als N-Quelle bei gleichzeitiger Verwendung von Glukose als C-Quelle studiert worden. Hierbei hat es sich merkwürdigerweise gezeigt, dass Azetamid, das also für *Aspergillus niger* eine sehr gute N-Quelle ist, für eine Reihe von Mucorineen in saurer Lösung als solche gar keine Verwendung findet und

in schwach alkalischer Lösung einen etwas besseren, jedoch aber sehr beschränkten Nährwert besitzt.

Ich führe hier in der folgenden Tabelle das zusammengestellte Resultat von zwei vollständig gleichen, jedoch zu verschiedener Zeit ausgeführten Versuchen (I und II) an.

Versuch No. 14.

Erlenmeyerkolben mit je 50 Cm³ Nährlösung: 1 % Azetamid, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Die Azidität betrug bevor der Infektion 2,3—2,4 Cm³ $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm³ Nährlösung. Reaktion mit Nessler: 0—× bis × (ɔ: äusserst schwache Gelbfärbung).

Nach 10 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum		Zur Neutralisation von 10 Cm³ Nährlösung nötige Menge $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$		Nessler	
	I	II	I	II	I	II
M. Mucedo	0—×	0—×	0,6 Cm³	0,6 Cm³	Nessler überall nur mit sehr schwacher Gelbfärbung (0)	
M. strictus	0—×	0—×	1,4	1,0		
M. flavus	0—×	0—×	0,4	0,5		
M. saturninus	0—×		0,4			
M. sphaerosporus	0—×	×	1,0	1,1		
M. hiemalis	×	×	1,5	1,9		
M. racemosus	×—××	××	3,0	2,5		
M. griseo-cyanus	×		3,0			
M. genevensis	0—×		3,2			
M. dispersus	0—×		1,3			
M. spinosus	×—××	×	1,5	1,5		
M. silvaticus	×	0—×	0,2	0,7		
M. circinelloides	×—××		1,9			
M. stolonifer	0—×	0—×	0,7	0,7		
M. nodosus	××	×—××	6,3	5,5		
Abs. Orchidis	×	×	0,5	0,6		
Abs. glauca	×		0,3			
Abs. cylindrospora	0—×	0—×	0,4	0,4		
Zyg. Moelleri	×—××	×	0,2	0,0		
Kontrolkolbe ohne Infektion			2,3	2,4	0—×	×

Aus diesen zwei Versuchen geht nun ohne weiteres hervor, dass dem Azetamid unter den hier gebotenen Wachstumsbedingungen aus irgend

einer Ursache als N-Quelle gar kein Wert zukommt. Wohl haben einige Arten das Wachstumszeichen × oder ×—××, *M. nodosus* sogar ××, bekommen, die Entwickelung ist aber auch bei diesen Arten eine verhältnismässig kümmerliche. Bei den meisten Arten, die das Wachstumszeichen o—× bekommen haben, sind die Sporen nur in kurzen Myzelschläuchen ausgekeimt und von Wachstum kann hier eigentlich nicht die Rede sein.

Dieser scheinbaren Unfähigkeit des Azetamids als N-Quelle zu dienen konnte nun mehreren Ursachen zugeschrieben werden. Erstens wäre es möglich, dass die Eiweisssyntese aus Azetamid gar nicht durch eine einfache Verkettung vorgeht, sondern dass vielmehr eine Ammoniakabspaltung zuerst stattfinden muss und zwar derart, dass sich durch H_2O-Anlagerung NH_3 und Essigsäure bilden, und dann erst aus dem losgewordenen Ammoniak die Stickstoffresorption stattfindet. Das negative Resultat der zwei oben beschriebenen Versuche konnte dann vielleicht daher kommen, dass die Mucorineen diese Ammoniakabspaltung nicht ausführen können, entweder weil sie ein hierzu nötiges Enzym nicht produzieren oder aus anderen Ursachen.

Selbst aber wenn sie diese Spaltung des Amids ausführen können, wäre dabei noch zu bedenken, dass die freigewordene Essigsäure schädliche Einflüsse auf sie ausüben kann. Nun ist, wie aus der Tabelle hervorgeht, in der Nährflüssigkeit eigentlich keine schädliche, hohe Azidität nachweisbar. Die höchste Azidität zeigt die Kulturflüssigkeit bei *M. nodosus*, 6,3 und 5,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ entsprechend, eine Azidität, die, wenn sie durch die verhältnismässig wenig ionisierten organischen Säuren bewirkt wird, eigentlich gar nicht schädlich wirkt. Es ist übrigens im Voraus wahrscheinlich, dass die Azidität bei *M. nodosus* in diesem Versuche gar nicht durch Essigsäure, sondern durch eine andere noch nicht bestimmte organische Säure, die als Atmungsprodukt des Zuckers entsteht, herrührt. Allenfalls habe ich in ziemlich vielen verschiedenen Kulturen eben bei *M. nodosus* eine derartige Produktion einer unbekannten Säure beobachtet. Für den meisten anderen Arten ist aber im obigen Versuche die Azidität eine viel kleinere und kann gar nicht einem absolut entwickelungshemmenden Einfluss zugeschrieben werden.

Es ist aber wahrscheinlich, dass eine eventuelle Spaltung des Amids in Essigsäure und Ammoniak, selbst wenn sie von enzymatischer Natur ist, nur innerhalb der Zelle, also im Protoplasma des Pilzes stattfindet. Dabei ist dann nicht ausgeschlossen, dass eine eventuel gebildete Essigsäure innerhalb der Zelle in grösserer und schädlicherer Konzentration als ausserhalb derselben auftreten kann.

Ich beschloss daher einen dritten Kulturversuch mit Azetamid auszuführen und zwar unter Zusatz von Calciumkarbonat im Überschuss, um während des ganzen Versuches eine schwach alkalische Reaktion der Nährflüssigkeit zu behalten. Das Resultat des Versuches giebt die folgende Tabelle:

Versuch Nr. 15.

Erlenmeyerkolben, mit je 50 Cm³ Nährlösung. 1 % Azetamid, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung; dazu die zur Neutralisation dienende Menge Calciumkarbonat — 0,8 %.

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10 Tagen wurde gefunden:

<table>
<tr><th></th><th>Wachstum</th><th>Nessler</th></tr>
<tr><td>Aspergillus niger</td><td>×××</td><td>×</td></tr>
<tr><td>M. Mucedo</td><td>×</td><td rowspan="18">} o</td></tr>
<tr><td>M. strictus</td><td>o—×</td></tr>
<tr><td>M. flavus</td><td>o—×</td></tr>
<tr><td>M. saturninus</td><td>×—××</td></tr>
<tr><td>M. sphaerosporus</td><td>××</td></tr>
<tr><td>M. racemosus</td><td>×—××</td></tr>
<tr><td>M. hiemalis</td><td>×</td></tr>
<tr><td>M. genevensis</td><td>×—××</td></tr>
<tr><td>M. griseo-cyanus</td><td>××</td></tr>
<tr><td>M. spinosus</td><td>×—××</td></tr>
<tr><td>M. circinelloides</td><td>×—××</td></tr>
<tr><td>M. silvaticus</td><td>×—××</td></tr>
<tr><td>M. stolonifer</td><td>×</td></tr>
<tr><td>M. nodosus</td><td>×</td></tr>
<tr><td>Abs. Orchidis</td><td>×—××</td></tr>
<tr><td>Abs. glauca</td><td>×</td></tr>
<tr><td>Abs. cylindrospora</td><td>×—××</td></tr>
<tr><td>Zyg. Moelleri</td><td>××</td></tr>
</table>

Aus dieser Tabelle geht nun durch Vergleich mit dem Vorigen hervor, dass die meisten Arten in der schwach alkalischen Lösung mit Azetamid wohl etwas besser gedeihen, jedoch ist für sämtliche diese Arten im Vergleich mit *Aspergillus niger* das Wachstum ziemlich schlecht.

Die zwei Arten *M. flavus* und *M. strictus* sind nur gekeimt und von Wachstum ist hier keine Rede.

Der Versuch hat also auf die Frage nach den Ursachen des schlechten Wachstums mit Azetamid als N-Quelle keine entscheidende Antwort

gegeben. Zwar ist bei alkalischer Flüssigkeit die Entwickelung der Pilze deutlich besser als in schwach saurer, jedoch ist sie keine so grosse, dass wir das Azetamid als guten Nährstoff ansehen können. Sowohl in schwach saurer wie in schwach alkalischer Lösung muss das Azetamid als eine schlechte bis kaum mittelwertige N-Quelle für den Mucorineen angesehen werden. Vielleicht beruht dieses darauf, dass die Mucorineen die Abspaltung von Ammoniak aus der Amidverbindung nicht oder nur langsam bewirken können und daher aus Mangel an Stickstoff nicht wachsen. Nun werden natürlich selbst durch vorsichtige Sterilisierung der amidhaltigen Flüssigkeit kleine Ammoniakmengen abgespalten, und eben diese können dann die kleine Entwickelung der meisten Arten gestatten. Bei dem sehr gut wachsenden *Aspergillus niger* findet ohne Zweifel eine Ammoniakabspaltung statt, denn die Nährflüssigkeit, die vor dem Versuche mit Nessler nur eine schwache Gelbfärbung gab, giebt hier nach 10-tägigem Kultur augenblickliche, starke Gelbfärbung und bedeutende Fällung. Bei den Mucorineen dagegen sind nach 10 Tagen nicht einmal Spuren von Ammoniak nachweisbar, und selbst die schwache Gelbfärbung, die mit Nessler vor der Infektion gefunden wurde, ist jetzt ganz verschwunden.

5. Harnsäure.

Eine Zersetzung der Harnsäure durch Organismen ist bis jetzt eigentlich nur für die Bakterien bekannt. Hier haben mehrere Untersuchungen, so vor allem die von L. und F. Sestini (Landwirtsch. Versuchsst. Bd. XXXVIII, 1890), Ulpiani und Cingolani (1903 — Gaz. chim. Ital. Vol. XXXIII (II)), Gérard (1896) u. s. w. gezeigt, dass die Harnsäure durch die Tätigkeit einer Bakterie, *Bacterium acidi urici*, einer energischen Spaltung unterliegt, wobei Kohlensäure und Ammoniak als Endprodukte der Spaltung entstehen. Die chemische Seite dieser Spaltung, wie z. B. die intermediär entstehenden Verbindungen, Dialursäure und Harnstoff, soll hier nicht näher besprochen werden.

Für die Pilze ist nun eine Harnsäurespaltung meines Wissens nach nicht näher untersucht. Zwar giebt wohl Czapek (Biochemie der Pflanzen) an, dass Harnsäure für *Aspergillus niger* als guter Nährstoff zu betrachten ist, weitere Angaben hierüber sind mir aber unbekannt.

Meine eigenen Untersuchungen betreffs der pilzlichen Harnsäurespaltung sind leider wenig umfassend geworden. Ich habe nur bei einer Reihe von Arten konstatiert, dass Harnsäure eine sehr gute Stickstoffquelle ist, und zwar entwickeln sich die Pilze, wenn Harnsäure als solche,

also fast ungelöst, die Nährflüssigkeit zugesetzt ist, sehr gut und fruktifizieren reichlich. Die folgende Tabelle giebt das Resultat eines Kulturversuches mit Harnsäure als einzige Stickstoffquelle.

Versuch Nr. 16.

Erlenmeyerkolben mit je 50 Cm³ Nährlösung: 1 % Harnsäure, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

	Wachstum	Azidität oder Alkalität in Cm³ $\frac{n}{50}$ Flüssigkeit pro 10 Cm³ Nährlösung gemessen: $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	$\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	Nessler
M. Mucedo	×××	neutral		o—×
M. strictus	××		0,4	o—×
M. flavus	×××	neutral		o—×
M. sphaerosporus	××	neutral		o—×
M. racemosus	×××	neutral		o—×
M. hiemalis	×××	neutral		o—×
M. spinosus	×××	neutral		o—×
M. stolonifer	×××		1,8	o—×
M. nodosus	×××		4,6	o—×
Abs. Orchidis	×××		1,0	o
Zyg. Moelleri	××	0,8		o—×

In diesen Kulturen ist nun die freie Harnsäure fast ungelöst in der Kulturflüssigkeit vorhanden. Da sich die Säure bei 20° C. erst in 14000 Teilen Wasser löst, ist also in jedem Kolben (mit 50 Cm³ Nährlösung) nur 0,00357 Gram gelöst und der Rest ungefähr 0,5 Gram ungelöst vorhanden. Trotzdem ist das Wachstum sämtlicher Pilze sehr gut, was wohl nicht anders gedeutet werden kann, als dass sie die gelöste Säure sehr energisch spalten und dadurch neue Mengen in Lösung bringen, die wieder zerlegt werden.

Die Endprodukte der Harnsäurespaltung ist wahrscheinlich auch hier Kohlensäure und Ammoniak. Wie aus der Tabelle hervorgeht ist die Ammoniakreaktion der Nährflüssigkeit eine schwache (o bis ×). Dies kommt jedoch wohl daher, dass die gebildeten Ammoniakmengen der schweren Löslichkeit der Harnsäure wegen nur verhältnismässig gering sind und zum Eiweissaufbau schnell verwendet werden.

Bis auf weiteres kann ich also nur mitteilen, dass die Harnsäure für die Mucorineen eine sehr gute Stickstoffquelle ist, und dass sie daher auf irgend eine Weise gespalten werden muss, wobei wahrscheinlich Ammoniak eins der Endprodukte ist. Um näheres über die chemische Seite der Spaltung, z. B. eventuelle intermediär entstehende Verbindungen, zu entscheiden, müssen zuerst Versuche mit Harnsäure in gelöster Form, z. B. als Natriumsalz oder in Verbindung mit Phosphorsalze, angestellt werden.

6. Aminosäuren.

In mehreren seiner Arbeiten (1901—1902 — Biochemie d. Pflanzen) hat Czapek sich auf zahlreiche Kulturversuche stützend die Aminosäuren als eine für die Pilze besonders gute Stickstoffquelle hervorgehoben. Die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse seiner und anderer Untersuchungen findet sich in der vortrefflichen Biochemie der Pfllanzen zusammengestellt und braucht wohl hier nicht näher besprochen werden. Nur mag hervorgehoben werden, dass es Czapeks Meinung nach eben die Aminosäuresyntese ist, die in dem pilzlichen Eiweissaufbau die erste Stufe sei, und dass ferner eben diese Aminosäuresyntese aus den gebotenen Stickstoffverbindungen ein Prozess sei, der den Pilzen sozusagen eine besondere Schwierigkeit macht. Wenn erst die Aminosäuren mit ihrer besonders starken N-Bindung: $CHNH_2$, formiert sind, werden durch ihre Verkettung über die Polypeptide die Eiweisskörper relativ leicht gebildet.

Die Darbietung von fertigen Aminosäuren als Stickstoffquelle, wobei den Pilzen also die erste Stufe der Eiweisssyntese erspart wird, befördert daher in ausgezeichneter Weise das Wachstum.

Eine wichtige Stütze dieser seiner Annahme findet Czapek auch durch die von Emmerling (1902) gemachten Beobachtungen, wonach eben nur die bei der Eiweisshydrolyse entstehenden α-Aminosäuren die Entwickelung der Pilze begünstigen, und nicht die künstlich darstellbaren β- und γ-Säuren.

In Einklang mit der Czapek'schen Annahme von der direkten Verwendung der Aminosäuren stehen nun eigentlich nicht die späteren Beobachtungen von Raziborski (1906). Dieser sucht besonders die chemischen Prozesse, die bei der Aminosäureverarbeitung stattfinden, etwas näher zu studieren und er kommt zu dem Schlusse, dass ihrer Assimilation immer eine Spaltung vorausgeht, wobei Ammoniak und die entsprechende stickstofflose Verbindung (Oxysäuren) gebildet werden.

Der Stickstoff soll also erst als Ammoniak für die Eiweisssyntese Verwendung finden. Die entstehende Oxysäure kann als Atmungsquelle dienen, wobei sie weiter oxydiert wird.

Ich habe nun bei meinen Versuchen nicht eine Untersuchung der rein chemischen Seite der Aminosäureassimilation berücksichtigt. Es hat mich vielmehr besonders die biologische Seite der Frage interessiert und vor allem, ob die Aminosäuren mit oder ohne Kohlenstoffzugabe verarbeitet werden, und besonders in welchem Grade hierbei eine Ammoniakabspaltung stattfindet. In der folgenden Darstellung finden sich dann die Kulturversuche mit den verschiedenen Aminosäuren zusammengestellt.

Glykokoll.

Glykokoll oder Aminoessigsäure, CH_2NH_2COOH, ist nach CZAPEK (1902), für *Aspergillus niger* unter gleichzeitiger Zuckerdarbietung eine gute Stickstoffquelle, während sie ohne Zuckerzusatz als einzige, sowohl N- wie C-Quelle, nur ein dürftiges Wachstum gestattet. RAZIBORSKIS Untersuchungen bestätigen dies und zeigen ausserdem, dass Kulturen ohne Zuckerzugabe eine starke Ammoniakreaktion aufweisen können; in Kulturen mit Zugabe von 5 % Saccharose ist diese Ammoniakreaktion eine viel schwächere, jedoch aber noch deutliche.

Ich stellte nun zuerst einen Kulturversuch an, bei dem Glykokoll (in 1 Prozent Konzentration) als gleichzeitige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle gegeben wurde, also ohne Zuckerzugabe. Durch diesen Versuch sollte zuerst untersucht werden, in welchem Grade und von welchen Arten das Glykokoll angegriffen wird. Zweitens sollte ermittelt werden, ob die Mucorineen hierbei eine Spaltung des Glykokolls in Glykolsäure und Ammoniak bewirken können. Die Resultate des Versuches sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Versuch Nr. 17.

Reagensgläser mit je ca. 10 Cm^3 Nährlösung: 1 % Glykokoll und gewöhnl. Salzlösung. Die Azidität betrug vor der Infektion 3,7 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Nährlösung.

Temperatur 20—21° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Alkalität oder Azidität in Cm³ $\frac{n}{50}$ Säure oder Lauge pro 10 Cm³ Nährlösung gemessen		Nessler
		$\frac{n}{50}$ Ba(OH)$_2$	$\frac{n}{50}$ H_2SO_4	
M. Mucedo	o—×	2,0 Cm³		o—×
M. saturninus	o—×	2,0 »		o—×
M. flavus	o—×	2,0 »		o—×
M. sphaerosporus	×—××		8,7 Cm³	×××
M. racemosus	×	neutral		×
M. hiemalis	×	neutral		×
M. dispersus	o—×	2,0 »		o—×
M. silvaticus	o	2,7 »		o—×
M. circinelloides	×—××		5,5 »	×××
Abs. Orchidis	×—××		7,0 »	×××
Abs. cylindrospora	×—××		17,0 »	×××
Abs. spinosa	×—××		14,4 »	×××
Abs. glauca	×—××		13,5 »	×××
Zyg. Moelleri	×—××		6,5 »	×××
Kontrolle ohne Infektion		3,7 »		o

Der Versuch zeigt also zuerst, dass das Glykokoll als einzige C- und N-Quelle geboten für die verschiedenen Arten einen recht variirenden Nährwert besitzt. Von den 14 geprüften Arten zeigen nach 10 Tagen nur genau die Hälfte, oder sieben Arten, eine obwohl recht kümmerliche Entwickelung (Wachstum: × bis ××). Von den übrigen zeigen zwei Arten ein kümmerliches Wachstum (×), während die übrigen 5 nur gekeimt sind und weitere Entwickelung nur äusserst spärlich zeigen (Wachstum o bis ×).

Nun geht aber ferner aus der Tabelle in der schönsten Weise hervor, dass jedes Wachstum von einer Ammoniakabspaltung begleitet wird. Bei den sieben verhältnismässig gut gewachsenen Arten giebt die Kulturflüssigkeit mit Nesslers Reagens grosse Mengen von einem braunroten Niederschlage (Reaktionszeichen: ×××) und die anfangs schwach saure Flüssigkeit hat durch das abgespaltene Ammoniak eine Alkalität von 5,5 bis 17,0 Cm³ $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 (pro 10 Cm³ Nährlösung) bekommen. Die zwei schlecht gewachsenen Arten *M. hiemalis* und *M. racemosus* haben viel weniger Ammoniak abgespaltet, und die Nährflüssigkeit ist dann nur neutral geworden. Bei den 5 nicht gewachsenen Arten dagegen, sind keine oder nur kleine Ammoniakmengen gebildet, und die Nährflüssigkeit hat ihre Azidität fast unverändert behalten.

Wenn also Glykokoll als einzige Nährsubstans geboten wird, können es mehrere der untersuchten Mucorineen angreifen. Dabei wird Ammoniak abgespalten und die freigewordene Glykolsäure wird dann für die Atmung verwendet. Auf welche Weise die Eiweisssyntese stattfindet, zeigt der Versuch jedoch nicht, denn die auftretenden Ammoniakmengen können ja ausschliesslich von dem für die Atmung dienenden Teil des Glykokolls stammen, und der Eiweissaufbau kann dann entweder durch direkte Verwendung des Glykokolls oder auch von abgespaltenem Ammoniak aus stattfinden.

Dass einige Arten augenscheinlich mit Glykokoll als einzige Nährquelle nicht wachsen, kommt wahrscheinlich daher, dass ihnen die Glykolsäure als Atmungsquelle nicht dienen kann, und nicht aus Mangel an Fähigkeit das Glykokoll zu spalten.

Es würde darum von Interesse sein, die Glykokollspaltung in Kulturen mit Zuckerzusatz zu studieren. Ich habe hier zu verschiedener Zeit zwei sonst völlig gleichwärtige Versuche angestellt, in denen den Pilzen 1 % Glykokoll und gleichzeitig 1 % Glukose geboten wurde. Der eine Versuch wurde nach 5 Tagen, der andere erst nach 10 Tagen abgebrochen. Die Resultate beider Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Versuch Nr. 18.

Reagensgläser mit je ca. 10 Cm^3 Nährlösung: 1 % Glykokoll, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Zwei Versuchsserien, A und B, wobei A nach 5 Tagen, B erst nach 10 Tagen untersucht wurde.

Temperatur ca. 20° C. Ohne Lichtzutritt. (Siehe Tabelle S. 60).

Aus diesem Versuch geht nun hervor, dass das Glykokoll bei gleichzeitiger Zuckerzugabe eine sehr gute Stickstoffquelle für die Mucorineen ist. Schon nach 5 Tagen zeigen fast sämtliche Arten ein sehr gutes Wachstum und nach 10 Tagen ist die Entwickelung sehr schön und stark. Nur zwei Arten, *M. nodosus* und *M. strictus* nehmen hier eine besondere Stellung ein. Nach 5 Tagen hat der letztere eben nur zu keimen begonnen und zeigt ein kleines submerses Myzelium, während *M. nodosus* nicht einmal gekeimt hat. Erst nach dem Verlaufe weiterer 5 Tage sind beide Arten in Wachstum gekommen und entwickelten sich dann relativ schnell und gut. Dieses besondere Verhalten, also eine späte Keimung und sehr langsames Wachstum der jungen Kolonien habe ich bei diesen zwei Arten immer in Glykokollnährlösungen gefunden. Wie dies Verhähtnis zu erklären ist, weiss ich nicht, führe es jedoch hier auf.

	Serie A (nach 5-tägiger Kulturdauer)					Serie B (nach 10-tägiger Kulturdauer)				
	Wachstum	Azidität oder Alkalität in Cm^3 $\frac{n}{50}$ Flüssigkeit pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen: $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	$\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	Nessler	Oxalsäure (mit Ca-Azetat und Eisessig)	Wachstum	Azidität oder Alkalität in Cm^3 $\frac{n}{50}$ Flüssigkeit pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen: $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	$\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	Nessler	Oxalsäure (mit Ca-Azetat und Eisessig)
M. Mucedo	×××		3,2	×	o	×××	9,5		×××	
M. strictus	×				o		nicht untersucht			
M. saturninus	×××		3,5	o	o	×××		3,0	o—×	o
M. flavus	×××		3,7	o—×	o	×××	4,4		×	o
M. sphaerosporus	×××	3,0		×	o	×××	16,0		×××	o
M. racemosus	×××	3,3		×××	o	×××	11,0		×××	o
M. Christianiensis	×××		1,0	×	o		nicht untersucht			
M. dispersus	×××		4,4	o	o	×××	1,0		o—×	
M. genevensis	×××	0,4		×	o		nicht untersucht			
M. hiemalis	×××	0,6		×	o	×××	18,0		×××	
M. griseo-cyanus	×××	0,2		×	o		nicht untersucht			
M. silvaticus	×××	1,8		××	o	×××	6,6		××	
M. spinosus	×××	8,4		×××	o	×××	22,0		×××	
M. circinelloides	×××	5,4		×××	o	×××	13,5		×××	
M. stolonifer	×××		0,6	×	o		nicht untersucht			
M. nodosus	o				o		nicht untersucht			
Abs. Orchidis	×××		1,5	×	o—×	×××		1,0	×××	×××
Abs. glauca	×××	2,7		×××	×××	×××	1,3		×××	××
Abs. cylindrospora	×××	6,8		×××	×	×××	16,0		×××	×
Abs. spinosa	nicht untersucht					×××		0,8	×××	×××
Zyg. Moelleri	×××	5,6		×××	o	×××	13,4		×××	

Bei den allermeisten Arten findet nun, wie besonders die Untersuchung der 10 Tage alten Kulturen zeigt, eine ziemlich energische Ammoniakabspaltung statt. Es sind eigentlich nur zwei Arten, *M. dispersus* und *M. saturninus,* die selbst nach 10 Tagen in der Nährflüssigkeit keine Ammoniakreaktion zeigen. An diese beiden reiht sich dann auch *M. flavus* mit seiner ziemlich bescheidenen Ammoniakabspaltung an. Bei allen den anderen Arten, *M. nodosus* und *M. strictus* ausgenommen, ist aber die Ammoniakabspaltung selbst also bei Zuckerzugabe eine recht bedeutende. Da nun wahrscheinlich die Glykolsäure in diesen Kulturen durch die Glukose vollständig geschützt wird, also nicht als Atmungsquelle dient, kann das Ammoniak nicht von einer diesem Zwecke dienenden Zerlegung des Glykokolls herrühren. Es ist vielmehr höchst wahrscheinlich, dass das Glykokoll von den Pilzen durch eine enzymatische Tätigkeit gespalten wird, und dass dabei Ammoniak entsteht. Ob nun dieses Ammoniak den Ausgangspunkt für die Eiweisssyntese ist, oder ob auch gleichzeitig eine direkte Verarbeitung des Glykokolls stattfindet, lässt sich natürlich nicht sicher entscheiden. Es scheint mir aber, dass eine Ammoniakabspaltung, die wie bei *M. spinosus* mehr als 22,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung entspricht, eine viel zu grosse ist, um nur als ein der Assimilation parallel laufender Seitenprozess betrachtet zu werden. Vielmehr halte ich es für sehr wahrscheinlich, dass nur das aus Glykokoll abgespaltene Ammoniak für die Eiweisssyntese Verwendung findet.

Auch in diesen Versuchsreihen mit Glykokoll zeichnen sich die *Absidia*-Arten durch ihre energische Oxalsäure-Bildung aus. Die Oxalsäure tritt in Kulturen ohne Zucker, also nur mit Glykokoll, nicht auf, ist aber in allen Versuchen mit Zuckerzugabe sehr auffällig und konstant. Die Säure ist wohl dann auch hier als ein unvollständiges Atmungsprodukt der Glukose zu betrachten. Die Menge der produzierten Säure ist bei den einzelnen Arten eine recht verschiedene. Bei *Abs. Orchidis, Abs. glauca* und *Abs. spinosa* ist die Säureproduktion so gross, dass die abgespaltenen recht bedeutenden Ammoniakmengen ungefähr neutralisiert sind, während bei *Abs. cylindrospora,* wo verhältnismässig wenig Säure produziert ist, die Reaktion der Flüssigkeit stark alkalisch ist. Der Unterschied zwischen den zwei nahe stehenden Arten *Abs. cylindrospora* und *Abs. spinosa,* der hier zu Tage tritt, ist sehr interessant und spricht auch für eine Auffassung, wonach diese beiden Pilze als verschiedene Arten angesehen werden.[1] Bei beiden Arten sind die gebildeten Ammoniakmengen, wie ein anderer Versuch zeigt, ungefähr von gleicher Grösse; *Abs. cylindrospora* produziert

[1] Siehe: HAGEM, O., Neue Untersuchungen über norwegische Mucorineen. Annales Mycologici 1910.

aber wenig Oxalsäure, *Abs. spinosa* dagegen viel, und dadurch wird bei der letzteren das Ammoniak neutralisiert, so dass die Reaktion der Nährflüssigkeit 0,8 Cm^3. $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 entspricht, während bei *Abs. cylindrospora* die Reaktion eine stark alkalische, 16,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährflüssigkeit entsprechende, ist.

Alanin.

Alanin, α-Aminopropionsäure, $CH_3 . CH(NH_2) . COOH$ nimmt unter den Säuren der Essigsäurereihe, wie CZAPEK für *Aspergillus niger* zeigt, eine besondere Stellung ein, indem es in ziemlich hohem Grade als gleichzeitige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dienen kann. In einem seiner Versuche wurde z. B. mit 1 % Alanin und 3 % Rohrzucker eine Trockenernte von 624,4 Mg. erreicht, während eine 4 % Alaninlösung ohne Zucker nicht weniger als 212,7 Mg. gab.

Dieser Fähigkeit des Alanins zugleich als Kohlenstoffquelle zu dienen, kann nur dadurch eine Erklärung finden, dass die bei seiner Verarbeitung gebildete α-Oxypropionsäure oder Milchsäure für die Atmung Verwendung findet, was wohl mit den übrigen Oxysäuren dieser Reihe nicht der Fall ist.

Durch einen Versuch, wobei Alanin in 1 prozentiger Konzentration als gleichzeitige und einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle geboten wurde, suchte ich nun erstens zu ermitteln ob die Mucorineen überhaupt im Stande sind diese Aminosäure anzugreifen und hierbei Ammoniak abzuspalten. Zweitens sollte hierbei dann auch untersucht werden für welche Arten und in welchem Grade die gebildete Oxysäure als Atmungsquelle verwendbar wäre. Das Resultat dieses Versuches zeigt die folgende Tabelle.

Versuch Nr. 19.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung: 1 % Alanin und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur ca. 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Die Azidität betrug vor der Infektion 0,7—0,8 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Nährlösung.

Nach 10-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Wachstum	Azidität oder Alkalität pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen	Nessler
M. Mucedo	o—×	0,8 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	×
M. strictus	××	7,5 —»—	×××
M. saturninus	o—×		
M. flavus	o—×	1,2 —»—	×
M. sphaerosporus	××	12,5 —»—	×××
M. racemosus	××	13,0 —»—	—»
M. Christianiensis	××	10,0 —»—	×××
M. hiemalis	××	15,2 —»—	×××
M. dispersus	o—×		
M. genevensis	×	8,1 —»—	×××
M. silvaticus	×	10,0 —»—	×××
M. spinosus	××	13,0 —»—	×××
M. circinelloides	××	8,8 —»—	××
M. stolonifer	××	5,5 —»—	××
M. nodosus	×	7,0 —»—	×××
Abs. Orchidis	×	9,6 —»—	×××
Abs. cylindrospora	××	14,2 —»—	×××
Abs. spinosa	××	14,0 —»—	×××
Zyg. Moelleri	××	12,5 —»—	
Kontrolle		0,7 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	o—×

Nur vier Arten kommen also mit Alanin als einzige C- und N-Quelle nicht aus. Von diesen zeigen *M. Mucedo* und *M. flavus* ein wohl makroskopisch sichtbares, jedoch sehr unbedeutendes Wachstum, während *M. saturninus* und *M. dispersus* nur ein äusserst unbedeutender, kaum wahrnehmbares, submerses Myzel gebildet haben. Das geringe Wachstum bei diesen vier Arten kann nun entweder daher kommen, dass sie das Alanin überhaupt nicht zu spalten vermögen oder auch daher, dass die hierbei entstehende Milchsäure als Atmungsquelle keine Verwendung findet. Wie der folgende Versuch zeigt ist es wahrscheinlich, dass *M. dispersus* und *M. saturninus* die Spaltung nicht, oder vielleicht korrekter, nur langsam ausführen können, denn sie gedeihen selbst in Alaninkulturen mit Glukosezusatz relativ schlecht. *M. Mucedo* und *M. flavus* dagegen wachsen mit Zuckerzuzatz sehr gut und verdanken daher ihre schlechte Entwickelung in diesem Versuche ohne Glukose nur der Unfähigkeit der Milchsäure, ihnen als Atmungsquelle zu dienen.

Die meisten Arten aber, im Ganzen 15 von 19 geprüften, können mit Alanin als einzige Nährsubstanz ziemlich gut herauskommen. Hierbei

findet, wie die Reaktion mit Nessler und die Titrierung zeigen, eine recht bedeutende Ammoniakabspaltung statt. Können wir voraussetzen, dass die Umwandlung des Alanins ungefähr nach der Gleichung: $CH_3 . CH(NH_2) . COOH + H_2O = CH_3CH(OH) . COOH - NH_3$ stattfindet, und dass also für jedes Molekyl gespaltenes Alanin ein Molekyl Ammoniak gebildet wird, so entspricht die Ammoniak-Alkalität bei *M. hiemalis* von 15,2 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung 0,005 168 gr. NH_3, oder es ist in der Nährflüssigkeit eine noch nicht verbrauchte Ammoniakmenge vorhanden, die einer Umwandlung von nicht weniger als 27,06 % des gebotenen Alanins entspricht.

Es muss ferner bemerkt werden, dass sich in keiner der Kulturen mit ausschlieslich Alanin Oxalsäure nachweisen lässt. Mit Essigsäure und Kalziumazetat tritt selbst nach mehreren Minuten keine Trübung oder Fällung ein.

In einigen folgenden Versuchen wurde nun dem Alanin 1 % Glukose zugegeben, um zu untersuchen ob auch bei guter Kohlenstoffzufuhr Ammoniak in der Kulturflüssigkeit auftrat. Wie die folgende Tabelle zeigt, ist dies in entscheidender Weise der Fall.

Versuch Nr. 20.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung: 1 % Alanin, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur ca. 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Zwei Serien, I und II. Serie I nach 5 Tagen, Serie II erst nach 10 Tagen abgebrochen und untersucht.

Die Azidität betrug vor der Infektion in Serie I 1,8 Cm^3 und in Serie II 1,2 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Nährflüssigkeit. Reaktion mit Nessler in beiden sehr schwach, nur als nach und nach eintretende Gelbfärbung — (o—×). (Siehe Tabelle Seite 65).

Wie die Tabelle zeigt, findet auch in Alaninkulturen mit Glukose eine deutliche Ammoniakabspaltung statt. So ist in Serie I nach 5 Tagen unter 20 geprüften Arten bei 14 mit Nesslers Reagens Ammoniak deutlich nachweisbar, bei den 6 anderen dagegen entweder nicht oder nur in so unbedeutend kleinen Mengen, dass es wohl schon bei der Sterilisation abgespalten worden ist. Nach weiteren 5 Tagen ist wie die Serie II zeigt, die Ammoniakabspaltung bei noch mehreren Arten nachweisbar, im Ganzen bei 15 von 17 untersuchten Arten. Nur bei *M. saturninus* und *M. dispersus*, die übrigens sehr schlecht gewachsen sind, ist selbst nach 10 Tagen keine oder eine höchst unbedeutende Ammoniakmenge vorhanden.

	Wachstum		Azidität oder Alkalität pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen		Nessler		Oxalsäure	
	I	II	I	II	I	II	I	II
M. Mucedo	××	×××	2,4 $Cm^3 \frac{n}{50} Ba(OH)_2$	4,0 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$	o—×	×××		
M. strictus	××	×××	2,0 » » —	3,3 » » —	o	××		
M. saturninus		×		0,7 » » $Ba(OH)_2$		o—×		
M. flavus	××	×××	2,0 » » —	neutral	o—×	×		
M. sphaerosporus	×	×××	1,5 » » —	4,5 » » H_2SO_4	×	××		
M. racemosus	××	×××	1,6 » » H_2SO_4		××	×××		
M. Christianiensis	××	×××	2,5 » » —	7,5 » » —	××	××		
M. hiemalis	××	×××	1,0 » » $Ba(OH)_2$	5,1 » » —	×	××		
M. griseo-cyanus	××		1,2 » » —		×			
M. dispersus	×	×	2,4 » » —	2,1 » » $Ba(OH)_2$	o—×	o		
M. genevensis	××	××	3,0 » » —	neutral	×	×		
M. silvaticus	××	×××	1,0 » » H_2SO_4	5,5 » » H_2SO_4	××	×××		
M. spinosus	××	×××	0,6 » » —	4,0 » » —	×	××		
M. circinelloides	××	×××	0,3 » » $Ba(OH)_2$	1,2 » » —	×	×		
M. stolonifer	×	×××	2,6 » » —	0,6 » » —	o—×	×		
M. nodosus	××		2,6 » » —		o—×			
Abs. Orchidis	××	×××	neutral	0,8 » » —	××	×××	×	××
Abs. glauca	×××		1,4 » » H_2SO_4		×××		×	
Abs. cylindrospora	××	×××	1,0 » » —	4,0 » » —	×××	×××	×××	×
Abs. spinosa		×××		neutral		×××		××
Zyg. Moelleri	××	×××	2,4 » » $Ba(OH)_2$	7,5 » » H_2SO_4	×	×××		
Kontrolle			1,8 » » —	1,2 » » —	o—×	o—×		

Diese zwei Arten haben auch eine sauer reagierende Nährlösung, während diese bei allen anderen Arten in Serie II nach beendetem Versuche neutral oder ziemlich stark alkalisch ist.

Die in der Nährflüssigkeit sich befindenden Ammoniakmengen sind keine unbedeutenden. Zum Teil ist wohl dieses Ammoniak an denen von den Pilzen selbst produzierten Säuren gebunden, zum grösseren Teil aber als freies Ammoniak zugegen, das wie bei *M. Christianiensis* und *Zyg. Moelleri* eine Alkalität pro 10 Cm^3 Nährlösung von 7,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 giebt und also einer Umwandlung von 13,35 % von dem gebotenen Alanin entspricht.

Wenn wir die Rubrik »Nessler« sowohl in Serie I wie II untersuchen, so ergiebt sich sobald, dass sich besonders die *Absidia*-Arten durch ihre energische Ammoniakabspaltung aus Alanin auszeichnen. In Serie I haben *Abs. glauca* und *Abs. cylindrospora* 5 Tagen nach das Reaktionszeichen ××× bekommen, *Abs. Orchidis* dagegen nur ××. Keine der anderen Arten zeigt nach dieser Zeit eine so intensive Fällung mit Nesslers Reagens wie eben diese drei *Absidia*-Arten. Auch nach 10 Tagen sind die Ammoniakmengen bei diesen Arten besonders gross; jedoch zeigen nun auch einige *Mucor*-Arten wie *M. Mucedo, M. Christianiensis* und *Zyg. Moelleri* eine fast ebenso starke Reaktion.

Bei sämtlichen *Absidia*-Arten sind endlich sowohl nach 5 wie 10 Tagen bedeutende Oxalsäure-Mengen nachweisbar, und bei *Abs. cylindrospora* wurde z. B. nach 5 Tagen mit Essigsäure und Bleiazetat eine besonders grosse Fällung von Ca-Oxalat beobachtet.

Auch für Alanin müssen daher die Versuchsresultate dahin resummiert werden, dass sowohl in Kulturen ohne als in Kulturen mit Glukose für die allermeisten Arten eine bedeutende Ammoniakmenge in der Kulturflüssigkeit nachweisbar ist, und dass daher wohl auch die Verarbeitung des Alanins von einer Spaltung in Ammoniak und Kohlenstoffkomponent begleitet wird, und dann erst der Ammoniak zur Eiweissyntese Verwendung findet.

Asparagin.

Asparagin, $COOH . CH(NH_2)CH_2CO . NH_2$, das Halbamid der Amidobernsteinsäure ist allgemeiner Erfahrung nach für die Pilze eine besonders gute Stickstoffquelle, und betreffs seiner Verarbeitung sind von mehreren Forschern interessante Mitteilungen gemacht. So giebt z. B. CZAPEK (1902 [a]) für *Aspergillus niger* an, dass dieser Pilz mit Asparagin ohne andere Kohlenstoffzugabe nur relativ schlecht herauskommt, während er mit Zuckerzusatz sehr gut gedeiht. In einem Versuche wurde mit

Asparagin ohne Zucker Trockengewichte von 18,6 bis 22,2 Mgr. erhalten, während gleichzeitiger Zusatz von 1,5 % Rohrzucker die Ernte auf 579,2—601,3 Mgr. erhöhte.

Auch BUTKEWITSCH (1903) konnte, nach seinen Untersuchungen über die Umwandlung des Stickstoffes der Amide und Aminosäuren, bestätigen, dass *Aspergillus niger* in Kulturen mit ausschliesslich Asparagin ziemlich schlecht wächst, während er mit Zuckerzugabe das Asparagin rasch verarbeitet, und zwar wurde hierbei sowohl der Amid- als der Aminstickstoff abgespaltet und konnte in der Kulturflüssigkeit als Ammoniak bestimmt werden.

Später ist nun endlich von RACIBORSKI (1906) die Verarbeitung des Asparagins durch *Aspergillus niger* untersucht worden, und zwar sowohl ohne Kohlenstoffzugabe als auch mit Zusatz von 5 % Saccharose. In dem ersten Falle zeigte hierbei die Nährflüssigkeit nach 8 Tagen eine bedeutende Ammoniakreaktion, im letzteren Falle dagegen keine.

Bei meinen eignen Untersuchungen über die Asparaginverarbeitung wurde nun zuerst in einem vorläufigen Versuche eine Reihe von Arten in Petrischalen auf Asparagin-Glukose-Agar (beide in 1 prozent. Konzentration) gezüchtet. Hierbei zeigte es sich, dass für die 14 verwendeten Erdboden-Mucorineen das Asparagin eine sehr gute Stickstoffquelle ist, indem es mit Glukosezusatz sowohl gutes Wachstum wie reichliche Fruktifikation gestattet. Gleichzeitig wurde aber auch bei den meisten Arten in den Petrischalen ein deutlicher Ammoniakgeruch beobachtet, der besonders bei *M. spinosus* äusserst stark war. Es deutete also der Versuch darauf hin, dass auch bei der Asparaginverarbeitung Ammoniak in grösseren Mengen abgespaltet wird, und es wurden daher, um dies näher zu untersuchen, weitere Versuche ausgeführt.

Zuerst soll hier ein Versuch besprochen werden, bei welchem das Asparagin in 1 prozentiger Konzentration den Pilzen als gleichzeitige C- und N-Quelle geboten wurde, also ohne jede andere Kohlenstoffverbindung.

Versuch Nr. 21.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung: 1 % Asparagin und norm. Salzlösung.

Die Azidität betrug vor der Infektion 0,8—1,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Nährlösung. Reaktion der Nährlösung mit Nessler 0 (keine Spur von Gelbfärbung).

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Wachstum	Alkalität in $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$ pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen	Nessler
M. Mucedo	o—×	5,0 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$	×
M. strictus	o—×		×
M. flavus	×	1,7 —»—	×
M. sphaerosporus	×	10,0 —»—	×××
M. racemosus	o		o
M. Christianiensis	×	11,3 —»—	×××
M. dispersus	o—×	1,0 —»—	o
M. hiemalis	×	16,0 —»—	×××
M. genevensis	o—×	1,2 —»—	×
M. silvaticus	×	14,0 —»—	×××
M. spinosus	×	12,6 —»—	×××
M. circinelloides	×	7,8 —»—	××
M. stolonifer	×	9,0 —»—	×××
M. nodosus	o		o
Abs. Orchidis	×	12,0 —»—	×××
Abs. spinosa	×	12,9 —»—	×××
Abs. cylindrospora	××	16,6 —»—	×××
Zyg. Moelleri	×	12,4 —»—	×××
Kontrollkolbe (ohne Infektion)		1,0 $Cm^3 \frac{n}{50} Ba(OH)_2$	o

Die meisten Arten können also mit ausschliesslich Asparagin nur schlecht gedeihen; ja einige scheinen sogar nicht auskeimen und wachsen zu können. Wo aber Wachstum stattfindet, da ist auch immer eine recht grosse Ammoniakbildung nachweisbar. Die ursprünglich schwach saure Nährlösung nimmt eine alkalische Reaktion an, die bei *Abs. cylindrospora* mit 16,6 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$ pro 10 Cm^3 Nährflüssigkeit ihr Maximum erreicht, und gleichzeitig zeigt auch eine mehr oder weniger intensive Reaktion mit Nesslers Reagens, dass diese Alkalität eben durch bedeutende Mengen von abgespaltenem Ammoniak bewirkt wird.

Endlich muss auch bemerkt werden, dass in keinen Kulturen Oxalsäure nachweisbar war.

Was nun die Verarbeitung von dem Kohlenstoffkomponent des Asparagins betrifft, so darf hier bemerkt werden, dass die bei der Spaltung wahrscheinlich gebildete Monooxybernsteinsäure oder Äpfelsäure von mehreren Arten ohne Zweifel als Kohlenstoffquelle verwertet wird und als Atmungsquelle dienen kann. Denn, wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigen nicht weniger als 12 von 19 geprüften Arten ein nicht unbedeutendes

Wachstum (× oder ××), was ja nur auf Kosten dieser Säure zu Stande kommen kann.

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen bei den anderen Aminosäuren wurde auch ein Kulturversuch mit Asparagin und Glukose ausgeführt und dabei untersucht, ob auch unter diesen Bedingungen Ammoniak in der Nährflüssigkeit auftrat.

Versuch Nr. 22.

Erlenmeyerkollen mit je ca. 50 Cm^3 Nährlösung: 1 % Asparagin, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Die Azidität betrug vor der Infektion 0,5—0,8 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Nährlösung. Reaktion der Nährlösung mit Nessler 0 (keine Spur von Gelbfärbung).

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Wachstum	Alkalität oder Azidität pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen	Nessler	Oxalsäure
M. Mucedo	×××	9,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	×××	
M. flavus	×××	1,0 » » $Ba(OH)_2$	0	
M. sphaerosporus	×××	14,0 » » H_2SO_4	×××	
M. racemosus	×××	11,0 » » —	×××	
M. Christianiensis	×××	14,0 » » —	×××	
M. dispersus	×	2,0 » » $Ba(OH)_2$	0	
M. hiemalis	×××	17,7 » » H_2SO_4	×××	
M. genevensis	×××	8,0 » » —	××	
M. spinosus	×××	16,0 » » —	×××	
M. stolonifer	×××	5,6 » » —	×	
M. nodosus	×××	10,0 » » —	××	
Abs. Orchidis	×××	5,0 » » —	×××	×××
Abs. spinosa	×××	13,0 » » —	×××	×××
Abs. cylindrospora	×××	18,2 » » —	×××	×
Zyg. Moelleri	×××	12,0 » » —	×××	
Kontrollkolbe (ohne Infektion)		0,6 » » $Ba(OH)_2$	0	

Aus diesem Versuche geht ohne weiteres hervor, dass auch bei Glukosezusatz jedem Wachstum ein Auftreten von Ammoniak parallel geht. Die Kulturflüssigkeit zeigt bei den meisten Arten eine sehr starke Reaktion mit Nessler, und ihre hohe Alkalität weist auf recht bedeutende Ammoniakmengen hin. Es liegt daher kein Zweifel vor, dass auch

bei der Verarbeitung von Asparagin eine Spaltung in Ammoniak und Oxysäure stattfindet.

Leuzin.

Das Leuzin, seiner Struktur zufolge eine α-Amino-Isobutylessigsäure oder $(CH_3)_2CH \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$, gehört wie bekannt zu den gewöhnlichen Abbauprodukten der Eiweissstoffe und wurde z. B. auch von BUTKEWITSCH (1903) bei der von *Aspergillus niger* bewirkten Peptonspaltung reichlich nachgewiesen. Die weitere Verarbeitung des Leuzins durch Schimmelpilze ist nun sowohl von CZAPEK (1902[a]) und BUTKEWITSCH (1903) wie neulich auch von RAZIBORSKI (1906) untersucht worden. Als Hauptresultat dieser Untersuchungen geht hervor, dass *Aspergillus* mit Leuzin als einziger Nährstoff kein oder nur ein geringes Wachstum zeigt; mit Zuckerzusatz dagegen kommt er sehr schön zur Entwickelung und, wie BUTKEWITSCH und RAZIBORSKI zeigen, wird hierbei der Aminstickstoff in bedeutenden Mengen als Ammoniak abgespaltet.

Bei meinen eignen Untersuchungen über die Verarbeitung des Leuzins wurde in Übereinstimmung mit den Versuchen bei den anderen Aminosäuren zuerst ein Kulturversuch angestellt, bei dem Leuzin in 1 prozentiger Konzentration als gleichzeitige C- und N-Quelle geboten wurde.

Versuch Nr. 23.

Reagensgläser mit je ca. 6—8 Cm³ Nährlösung: 1 % Leuzin und gewöhnl. Salzlösung.

Reaktion der Nährlösung vor dem Versuche leider nicht untersucht, wahrscheinlich jedoch wie im folgenden Versuche ungefähr neutral. Reaktion mit Nessler 0—X, d. h. sehr schwache Gelbfärbung.

Temperatur ca. 20° C. Ohne Lichtzutritt. (Siehe Tabelle Seite 71)

Die Mehrzahl der untersuchten Arten kommt also mit Leuzin als einzige C- und N-Quelle zu einem gewissen Grade aus und zeigt ein mehr oder weniger starkes Wachstum. Besonders *M. griseo-cyanus* und *Abs. cylindrospora* zeigen eine sehr schöne Entwickelung und dürfen daher ziemlich gut den Kohlenstoffkomponent dieser Aminosäure (ohne oder erst nach einer Spaltung) als Atmungsquelle verwenden können. Auch eine Reihe anderer Arten wie besonders *M. sphaerosporus*, *M. spinosus*, *M. silvaticus*, *Abs. Orchidis*, *Abs. spinosa* und *Zyg. Moelleri* zeigen ein ziemlich gutes Wachstum. Nur 5 von den neunzehn untersuchten Arten bleiben in ihrer Entwickelung ganz zurück, wahrscheinlich aus Mangel an geeigneter Kohlenstoffnahrung. Es sind diese *M. stolonifer* und *nodosus*

Nach 10-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Wachstum	Alkalität pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen	Nessler
M. Mucedo	×	1,6 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$	×
M. strictus	×	1,5 —»—	×
M. flavus	×	2,5 —»—	××
M. sphaerosporus	××	1,0 —»—	×××
M. saturninus	o—×	1,2 —»—	×
M. racemosus	o—×	2,0 —»—	o—×
M. Christianiensis	×	1,5 —»—	×
M. dispersus	o—×	1,0 —»—	o—×
M. genevensis	×	2,1 —»—	××
M. hiemalis	×	1,8 —»—	×
M. griseo-cyanus	×××	3,0 —»—	×××
M. spinosus	××	2,1 —»—	××
M. silvaticus	××	2,5 —»—	×××
M. stolonifer	o—×	0,6 —»—	×
M. nodosus	o—×	1,0 —»—	×
Abs. Orchidis	××	neutral	×××
Abs. cylindrospora	×××	2,8 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$	×××
Abs. spinosa	××	neutral	×××
Zyg. Moelleri	××	4,5 $Cm^3 \frac{n}{50} H_2SO_4$	×××

aus der Sectio *Rhizopus* und dazu *M. saturninus, M. dispersus* und *M. racemosus.*

Der Versuch zeigt nun ferner, dass bei Leuzin ohne Zuckerzusatz jedes Wachstum von einer Ammoniakabspaltung begleitet wird und zwar findet sich in mehreren Kulturen recht bedeutende Ammoniakmengen wie vor allem bei *M. sphaerosporus, M. griseo-cyanus, M. silvaticus, Abs. Orchidis, Abs. cylindrospora, Abs. spinosa* und *Zyg. Moelleri.* Bei allen diesen Arten giebt Nesslers Reagens grosse Mengen von einem braunroten Niederschlage.

Ehe wir aber auf eine nähere Besprechung von diesem Verhältnisse eingehen, darf der folgende Versuch erwähnt werden, wobei die Verarbeitung des Leuzins unter Glukosezusatz untersucht wurde.

Versuch Nr. 24.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung: 1 % Leuzin, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Reaktion der Lösung vor dem Versuche neutral und mit Nessler o—× (d. h. sehr schwache Gelbfärbung).

Temperatur 18—20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Alkalität oder Azidität pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen	Nessler	Oxalsäure
M. Mucedo	×××	6,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	o—×	
M. strictus	×××	3,0 —»—	×	
M. saturninus	×××	2,5 —»—	o—×	
M. flavus	×××	2,0 —»—	×—××	
M. sphaerosporus	×××	neutral	××	
M. racemosus	×××	1,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	×—××	
M. Christianiensis	×××	neutral	×—××	
M. hiemalis	×××	1,8 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	×—××	
M. genevensis	×××	0,4 » » H_2SO_4	×××	
M. dispersus	×	1,2 » » $Ba(OH)_2$	o—×	
M. griseo-cyanus	×××	neutral	××	
M. spinosus	×××	neutral	××	
M. silvaticus	×××	1,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4	××	
M. stolonifer	×××	9,0 » » $Ba(OH)_2$	o—×	
M. nodosus	×××	4,0 » » —	o	
Abs. Orchidis	×××	neutral	×××	o
Abs. cylindrospora	×××	3,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	×	o
Abs. spinosa	×××	4,8 » » —	×	o
Zyg. Moelleri	×××	neutral	××	
Kontrolle (ohne Infektion)		neutral	o—×	

Auch hier findet also eine deutliche Ammoniakabspaltung statt.

Jedoch unterscheiden sich die beiden letzten Versuchen mit Leuzin von allen anderen Aminosäure-Kulturen dadurch, dass die Nährlösung nach beendetem Versuch trotz der starken Ammoniakreaktion eine relativ sehr niedrige Alkalität besitzt.

Wenn wir nämlich z. Vergleich die Versuche mit Glykokoll Asparagin und Alanin, sämtliche ohne Zucker, betrachten, so sehen wir (Versuche 17—19—21), dass hier gutes Wachstum nicht nur von einer starken Ammoniakreaktion sondern auch von einer hohen Alkalität der Nährlösung begleitet wird. In den oben beschriebenen Kulturen auf Leuzin (Versuch 23) dagegen ist wohl Wachstum von Ammoniakreaktion begleitet, die hohe Alkalität aber bleibt aus. Dies geht ohne weiteres aus den respektiven Tabellen hervor. Um es aber hier noch einmal anschaulich zu

machen, sind in der folgenden kleinen Tabelle die Alkalitätszahlen, Ammoniakreaktionen u. s. w., für 5 Arten aufgeführt. Die Alkalität ist in Cm³ $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm³ Nährlösung gemessen (Indikator: Kongorot).

Ohne Glukose.

	1 % Glykokoll			1 % Asparagin		
	Wachstum	Alkalität	Nessler	Wachstum	Alkalität	Nessler
M. sphaerosporus	×	8,7	×××	××	12,5	×××
Abs. cylindrospora	×	17,0	×××	××	14,2	×××
Abs. spinosa	×	14,5	×××	××	14,0	×××
Abs. Orchidis	×	7,0	×××	×	9,6	×××
Zyg. Moelleri	×	6,5	×××	××	12,5	

	1 % Alanin			1 % Leuzin		
	Wachstum	Alkalität	Nessler	Wachstum	Alkalität	Nessler
M. sphaerosporus	×	10,0	×××	××	1,0	×××
Abs. cylindrospora	×	16,6	×××	×××	2,8	×××
Abs. spinosa	×	12,9	×××	××	neutral	×××
Abs. Orchidis	×	12,0	×××	××	neutral	×××
Zyg. Moelleri	×	12,4	×××	××	4,5	×××

Während also bei Glykokoll, Asparagin und Alanin gewöhnlich eine starke Ammoniakreaktion (×××) von einer hohen Alkalität von 10 Cm³ $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 oder mehr begleitet wird, finden wir dagegen bei Leuzin eine ebenso starke Ammoniakreaktion in einer neutralen oder schwach alkalischen Flüssigkeit.

Auch die Leuzinkulturen mit Glukose sind auf dieselbe Weise von denen der übrigen Aminosäuren durch die Reaktion der Nährlösung bedeutend abweichend. Die folgende kleine Tabelle giebt eine Übersicht der verschiedenen Versuche mit Aminosäuren und Glukose mit Rücksicht auf die Reaktion der Nährlösung nach 10-tägiger Kulturdauer. Die Arten, die in die einzelnen Klassen (Sauer, Neutral, Alkalisch) gehören, sind in Prozenten von der ganzen Artsanzahl bei jedem Versuche aufgeführt.

	Glykokoll	Asparagin	Alanin	Leuzin
Nährlösung alkalisch	80 %	87 %	71 %	16 %
— neutral	0	0	17 %	31 %
— sauer	20 %	13 %	12 %	53 %

Diesen sehr ins Auge fallenden Unterschied zwischen den Leuzinkulturen und den übrigen Aminosäuren vermag ich mir nicht ganz zu erklären. Dass ein bedeutender Unterschied zwischen der Verarbeitung z. B. von Glykokoll und Leuzin vorliegt, geht ohne weiteres hervor und wird noch mehr ins Auge fallend, wenn wir die folgende Tabelle betrachten, wo die Stärke der Ammoniakreaktion aufgeführt ist. Die Anzahl Arten, die in eine bestimmte Klasse fällt, ist auch hier in Prozenten von den im Ganzen bei jedem Versuch verwendeten Arten aufgeführt.

Reaktion mit Nessler		Glykokoll		Asparagin		Alanin		Leuzin	
Reaktions-Stärke	XXX	73 %	80 %	67 %	80 %	42 %	63 %	11 %	39 %
—»—	XX	7 »		13 »		21 »		28 »	
—»—	X–XX		7 »		7 »	16 »	27 »	17 »	33 »
—»—	X	7 »		7 »		11 »		16 »	
—»—	o–X	13 »	13 »		13 »	5 »	10 »	22 »	28 »
—»—	o			13 »		5 »		6 »	

Nun ist natürlich, wie in der Einleitung dieser Abhandlung erwähnt ist und hier nochmals ausdrücklich betönt werden darf, eine quantitative Bestimmung des Ammoniaks durch ein einfaches Eintröpfen von Nesslers Reagens in die Nahrlösung eine äusserst wenig exakte Metode. Wenn aber die Bestimmung durch die gewöhnliche Magnesia-Metode ausgeführt werden soll, erfordert eine Untersuchung von so zahlreichen Kulturen, wie ich sie in meinen Versuchen hatte, sehr viel Zeit, und selbst zu einer genaueren kolorimetrischen Metode mit Nessler (durch Verdünnen und Vergleichung der Farben) ist mir nicht Zeit genug geblieben.

Für meine nur orientierenden Versuche glaube ich aber, dass die wohl etwas rauhe Metode jedoch genügend zufriedestellend ist, und dass die hierdurch gewonnene Erfahrung zur Hauptsache richtig ist.

Untersuchen wir nämlich, was aus den zwei letzten Tabellen geschlossen werden kann, so sehen wir bald, dass wir in zwei Hinsichten, erstens betreffs der Reaktion der Nährlösung und zweitens betreffs der Ammoniakreaktion, einen erheblichen Unterschied zwischen den Glykokollkulturen und den Leuzinkulturen finden. In den Glykokoll- und in den Asparagin-Kulturen ist nach 10-tägiger Kulturdauer die Reaktion der Nährlösung bei den meisten Arten alkalisch (80 % und 87 %), bei einer relativ geringeren Zahl dagegen (20 % und 13 %) sauer.

Bei Leuzin sind im Gegenteil die meisten Kulturen sauer reagierend, und zwar dies 53 % von den verwendeten Arten, während 31 % neutral sind und nur 13 % alkalisch. Die Alaninkulturen bilden einen Übergang

zwischen den Glykokoll-Asparaginkulturen einerseits und den Leuzinkulturen andrerseits. Wohl reagiert auch hier die Mehrzahl der Kulturen (71 %) alkalisch, aber zusammen 29 % sind neutral oder sauer reagierend.

Was nun die Ammoniakreaktion betrifft, so zeigen die Glykokoll- und Asparagin-Serien übereinstimmende Verhältnisse. Bei jeder dieser Serien geben 80 % der verwendeten Arten eine starke Ammoniakreaktion (×× oder ×××), 7 % eine mittlere (× oder ×—××) und 13 % eine unbedeutende oder keine Ammoniakreaktion (o oder o—×). Die Leuzin-Serie zeigt ein ganz anderes Verhältnis. Nur 39 % der Kulturen geben starke Ammoniakreaktion (×× oder ×××), 33 % eine mittlere (× oder ×—××) und nicht weniger als 28 % endlich keine oder nur unbedeutende Ammoniakreaktion (o oder o—×). Auch hier bildet die Alanin-Serie einen Übergang mit 63 % (×× oder ×××), 27 % (× oder ××) und 10 % (o oder o—×).

Wie schon oben erwähnt wurde, ist diese Verschiedenheit in der Verarbeitung von Glykokoll und Asparagin einerseits und Leuzin anderseits nicht leicht zu erklären.

Die alkalische Reaktion der Glykokoll- und Asparagin-Serien den Leuzin-Serien gegenüber konnte vielleicht dadurch erklärt werden, dass die Ammoniakabspaltung in den ersten Serien bedeutend grösser ist. Dass dies der Fall ist, kann natürlich erst nach genauen quantitativen Ammoniakbestimmungen bewiesen werden. Es kommt mir aber vor, dass wir auch die Ursache anderswo suchen können und zwar besonders durch eine in den Leuzinkulturen stattfindende Säurebildung. Das Leuzin ist eine α-Amido-Isobutylessigsäure. Wird nun aus dieser durch H_2O-Anlagerung Ammoniak und die entsprechende Oxysäure frei, so ist nichts wahrscheinlicher als, dass eben diese komplizierte Säure gespaltet wird, und aus einem Molekyle der Oxysäure z. B. zwei Molekyle einer und derselben oder zwei verschiedener niedrigeren Säuren gebildet. Dadurch wird sich natürlich die Azidität beträchtlich erhöhen. Diese Aufspaltung der Oxysäure in zwei neuen Säuren musste dann nur bei Leuzin und vielleicht auch teilweise bei Alanin, jedoch nicht bei Glykokoll und Asparagin mit ihren verhältnismässig einfachen Oxysäuren stattfinden. Untersuchungen hierüber habe ich nun nicht ausgeführt; sie hören ja auch mehr in ein chemisches Laboratorium zu Hause.

Wie es sich nun mit der abweichenden Reaktion der Leuzinkulturen verhält, so ist jedoch die Leuzinverarbeitung in ihren Hauptzügen dieselbe wie bei den übrigen Aminosäuren. Die auftretenden Ammoniakmengen scheinen wohl etwas geringer zu sein, sind jedoch aber so bedeutend, dass

sie ohne Zweifel eine Spaltung der Aminosäure in Ammoniak und entsprechende Oxysäure voraussetzen, und dass also auch hier die Eiweisssyntese in freiem Ammoniak ihren Ausgangspunkt nimmt.

Zuletzt mag endlich darauf aufmerksam gemacht werden, dass in den Leuzinkulturen selbst bei den *Absidia*-Arten keine Oxalsäure auftritt. Dies ist etwas auffallend, wenn wir bedenken, dass die Oxalsäure nicht von den Aminosäuren gebildet wird, sondern wahrscheinlich einer unvollständigen Oxydation des Zuckers ihre Entstehung verdankt. Trotzdem muss aber also die Art der Stickstoffquelle auf eine indirekte Weise beeinflüssend wirken. Es wird aber dieses Verhältnis später in einem speziellen Kapitel über Säurebildung näher behandelt.

Tyrosin.

Die letzte von mir untersuchte Aminosäure war das Tyrosin, seiner Struktur zufolge eine Oxyphenyl-α-Aminopropionsäure oder C_6H_4OH. $CH_2CH(OH_2)COOH$. Auch die Verarbeitung von dieser Säure ist schon früher von Butkewitsch (1903) und Raciborski (1906) untersucht worden, und beide finden, dass ihre Assimilation von einer Ammoniakbildung begleitet wird. Butkewitsch stellt besonders fest, dass hierbei der Aminstickstoff in Ammoniakstickstoff umgewandelt wird. Besonders sind aber die von Raciborski gemachten Beobachtungen über die verschiedenen Abbauprodukte des Tyrosins von Interesse und sollen daher unten im Vergleich mit meinen eignen Versuchen näher besprochen werden.

In einem ersten Versuche wurden nun Kulturen mit 0,5 % Tyrosin ohne Glukose angestellt, um hierbei zu untersuchen ob die verschiedenen Arten aus dem Tyrosin ihren Kohlenstoffbedarf zu decken vermögen. Da das Tyrosin nur schwer im Wasser löslich ist, und die Einwirkung der Pilze dadurch vielleicht etwas erschwert wurde, habe ich die Kulturen anstatt nach 10 Tagen, erst nach 14 Tagen untersucht.

Versuch Nr. 25.

Reagensgläser mit je ca. 9 Cm^3 Nährlösung: 0,5 % Tyrosin und gewöhnl. Salzlösung.

Reaktion der Lösung mit Nessler nach der Sterilisierung 0—×, d. h. sehr schwache Gelbfärbung.

Temperatur 18—20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 14 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Nessler	Farbe der Nährlösung		Reduktion von ammoniakalischer Silberlösung	
			a. Ohne Zusatz	b. Mit Na(OH)	a. Bei 100⁰ C.	b. Bei 18⁰ C.
M. Mucedo	o—×	o—×			o—×	o
M. strictus	o—×	o	schwach rot			
M. racemosus	×	××	schmutzig braunrot	braun	×××	××
M. Christianiensis	××	×××	schmutzig braunrot	braun	×××	××
M. hiemalis	×	×			×	o—×
M. dispersus	o—×	o—×				
M. genevensis	×	××				
M. silvaticus	×××	×××	schwach rot	braun	×××	××
M. spinosus	o—×	×	schwach rot			
M. stolonifer	×	o—×	stark rot	sehr schwach braungelb	×	o—×
M. nodosus	×	×	stark rot		×	o—×
Abs. Orchidis	×××	×××			××	×
Abs. spinosa	×××	×××			×××	×
Abs. cylindrospora	×××	×××			×××	×
Zyg. Moelleri	××	××			××	o

Der Versuch zeigt nun zuerst, dass relativ wenige Arten mit ausschliesslich Tyrosin herauskommen. Es sind diese vor allem *M. silvaticus*, *Abs. Orchidis*, *Abs. spinosa* und *Abs. cylindrospora*, die alle sehr gut gediehen und üppipges Wachstum zeigten. Besonders *Abs. Orchidis* zeigt eine äusserst üppige Entwickelung mit einer kräftigen Myzeldecke und grossen blauvioletten Massen von reichlich fruktifizierenden Lufthyphen. Von den anderen sind nur *M. Christianiensis* und *Zyg. Moelleri* ziemlich gut gewachsen, während die übrigen, im Ganzen 9 Arten, verhältnismässig geringes oder kein Wachstum zeigen.

Bei sämtlichen gewachsenen Arten hat eine Ammoniakbildung stattgefunden, was deutlich aus der mit Nessler z. T. sehr starken Reaktion hervorgeht. Bei der Verarbeitung von Tyrosin wird also auch, wie schon bei einer Reihe von Aminosäuren gezeigt, immer Ammoniak abgespaltet.

Von besonderem Interesse wäre es nun, die Abbauprodukte des Tyrosins näher zu untersuchen. Da mir bei diesem Versuche nur kleine Mengen von der Nährlösung zur Verfügung standen, konnte ich nur einige ihrer Eigenschaften untersuchen und zwar besonders ihr Verhalten dem Alkali und der ammoniakalischer Silbernitratlösung gegenüber.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, hat sich die Nährlösung bei mehreren Arten durch irgend eines der Abbauprodukte des Tyrosins mehr oder weniger stark rot gefärbt. Besonders bei *M. stolonifer* und *M. nodosus* ist die rote Farbe sehr stark und zudem ganz rein, während bei *M. racemosus* und besonders *M. Christianiensis* etwas Braunes beigemischt ist. Bei *M. strictus*, *M. silvaticus* und *M. spinosus* endlich ist die Nährlösung nur sehr schwach, obwohl immer deutlich, rot gefärbt, und bei den anderen Arten vollständig farblos.

Es ist daher wahrscheinlich, dass die Rotfärbung der Nährlösung durch ein Enzym, eine Tyrosinase, und die von diesem gebildeten Abbauprodukte bewirkt wird.

Die letzte Rubrik der Tabelle zeigt das Verhalten der Nährlösung einer ammoniakalischen Silbernitratlösung gegenüber. Wie es hervorgeht, wird diese schon bei gewöhnlicher Zimmertemperatur von der Kulturflüssigkeit dreier Arten (*M. racemosus*, *M. Christianiensis* und *M. silvaticus*) fast augenblicklich stark reduziert. Ausserdem zeigen auch die 3 *Absidia*-Kulturen schon bei gewöhnlicher Temperatur ein bedeutendes (×) obwohl gar nicht so starkes Reduktionsvermögen. In der Siedehitze wird die Silbernitratlösung von sämtlichen diesen 6 Kulturen momentan vollständig reduziert, während bei dieser Temperatur auch einige andere Arten wie *Zygorhynchus Moelleri* eine stark reduzierende Nährlösung zeigten. Bei den übrigen Arten dagegen ist selbst beim Kochen nur eine kleine (×) oder keine Reduktionsfähigkeit zu beobachten. Besonders soll bemerkt werden, dass *M. stolonifer* und *M. nodosus* mit ihrem rotfärbenden Tyrosinderivat jedoch nur eine kleine Reduktionsfähigkeit besitzen, während anderseits eine stark reduzierende Nährlösung wie die des *M. silvaticus* keine Rotfärbung zeigt. Die Rotfärbung und die Reduktionsfähigkeit der Nährlösung haben also nichts mit einander zu tun und sind wohl mit Sicherheit durch zwei verschiedene Abbauprodukte bewirkt.

Von den Abbauprodukten, die wir hier besonders erwarten können, ist die Homogentisinsäure vor allen zu erwähnen. Eben diese Säure zeichnet sich durch ihre starke Reduktionsfähigkeit aus, amm. Silbernitratlösung wird von nicht zu verdünnten Lösungen der Säure selbst in der Kälte momentan reduziert. Zu ihrer Bestimmung müssen aber weitere Versuche ausgeführt werden, die ich noch nicht habe vornehmen können. Jedoch mag hier auf das Verhalten der Nährlösung Alkali gegenüber aufmerksam gemacht werden. Mit NaOH färbt sich die Lösungen von *M. racemosus*, *M. Christianiensis* und *M. silvaticus* stark gelbbraun bis braun, während bei *M. stolonifer* nur schwache Gelbfärbung eintritt.

In einem zweiten Versuche untersuchte ich nun endlich, wie sich die Ammoniakbildung bei reichlichem Zuckerzusatz verhielt.

Versuch Nr. 26.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung: 0,5 % Tyrosin, 1 % Glukose und norm. Salzlösung.

Reaktion der Nährlösung mit Nessler o—X, d. h. schwache Gelbfärbung.

Temperatur 19,5—21,0° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 14 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Azidität der Nährlösung pro 10 Cm^3 gemessen	Nessler
M. Mucedo	XXX	4,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	X
M. strictus	XXX	2,8 —»—	X
M. flavus	XXX	3,2 —»—	XX
M. sphaerosporus	XXX	neutral	X
M. racemosus	XXX	—»—	X
M. Christianiensis	XXX	—»—	X
M. hiemalis	XXX	0,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	X
M. dispersus	XXX	neutral	X
M. genevensis	XX	—»—	X
M. griseo-cyanus	XXX	—»—	o—X
M. silvaticus	XXX	—»—	X
M. spinosus	XXX	—»—	X
M. circinelloides	XXX	—»—	o—X
M. stolonifer	XXX	4,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	X
M. nodosus	XXX	12,5 —»—	X
Abs. Orchidis	XXX	neutral	o—X
Abs. glauca	XXX	—»—	o—X
Abs. cylindrospora	XXX	0,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	o—X
Zyg. Moelleri	XXX	neutral	X

Das Tyrosin ist also eine besonders ausgezeichnete Stickstoffquelle. Sämtliche Arten entwickeln sich sehr gut und fruktifizieren auch meistens reichlich. Selbst *M. dipersus*, der gewöhnlich langsam und nur submers wächst, hat sich hier gut entwickelt und bildet dicke, flottierende Decken mit Sporangienträgern.

Eine Ammoniakbildung ist bei recht zahlreichen Arten nicht nachweisbar (Nessler: o—X), bei den meisten aber, obwohl nicht stark doch immer recht deutlich (Nessler: X bis XX). Da aber das Tyrosin sehr

wenig löslich ist, geht wohl seine Spaltung etwas langsamer vor sich als bei den anderen Aminosäuren, und die gebildeten Ammoniakmengen sind daher auch wohl kleiner. Zudem kommt aber auch, dass das Ammoniak relativ schnell verarbeitet wird, weil die Kohlenstoffverbindung in einer doppelt so grossen Menge wie die Stickstoffverbindung gegeben ist.

Selbst wenn also die Reaktion mit Nessler nicht so stark ausfällt wie bei den übrigen Aminosäuren, darf wohl auch bei der Verarbeitung von Tyrosin eine Abspaltung des Aminstickstoffes als Ammoniak ohne Zweifel angenommen werden.

7. Pepton.

Das Pepton ist für sämtliche von mir untersuchten Erdboden-Mucorineen nicht nur eine gute Stickstoffquelle, sondern kann auch gleichzeitig als Kohlenstoffquelle dienen, wobei die verschiedenen Arten also mit Pepton als einzige organische Nährsubstans sehr gut herauskommen.

Bei der Zerzetzung des Peptons durch die Mucorineen hat mich nun ausser der gewöhnlichen Ammoniakabspaltung besonders die Produktion von proteolytischen Enzymen interessiert.

Es wurde zuerst, um über die Bildung der eiweisslösenden Enzymen bei den verschiedenen Arten eine Übersicht zu gewinnen, eine Reihe von Arten auf Pepton-Gelatine in Petrischalen kultiviert. Die Resultate dieses Versuches sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Versuch Nr. 27.

Petrischalen mit Nährgelatine: 2 % Pepton, gewöhnl. Salzlösung und 10 % Gelatine.

Temperatur ca. 20—22° C. Ohne Lichtzutritt.

Im Laufe der Entwickelung der Kulturen wurde gefunden:

	Beginn der Verflüssigung nach	Vollständige Verflüssigung ist eingetreten nach
M. Mucedo	8 Tagen	10 Tagen
M. strictus		15 —
M. Ramannianus		noch nicht nach 15 Tagen
M. saturninus	15 —	19 Tagen
M. sphaerosporus	15 —	24 —
M. racemosus	8 —	10 —
M. hiemalis	4 —	6 —
M. genevensis		22 —

	Beginn der Verflüssigung nach	Vollständige Verflüssigung ist eingetreten nach
M. dispersus		15 Tagen
M. griseo-cyanus		22 —
M. spinosus	15 Tagen	19 —
M. circinelloides	15 —	19 —
M. stolonifer	4 —	8 —
M. nodosus	4 —	5 —
Abs. Orchidis	5 —	10 —
Abs. glauca	5 —	10 —
Abs. cylindrospora	5 —	8 —

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, ist die Verflüssigungsfähigkeit für Gelatine in Pepton-Kulturen allenfalls eine recht verschiedene. Sie ist eine starke besonders bei *M. nodosus*, dann aber auch bei *M. stolonifer*, *M. hiemalis*, *M. racemosus* und den drei *Absidia*-Arten. Bei der Mehrzahl der Arten aber wird die Gelatine erst spät verflüssigt.

Es wäre aber von Interesse diese Verflüssigungsfähigkeit etwas näher zu studieren, und besonders die bei den verschiedenen Arten in der Nährflüssigkeit herausdiffundierten Mengen des proteolytischen Enzyms durch eine geeignete Methode genauer zu messen und wie möglich auch qualitativ zu untersuchen. Leider habe ich noch nicht Zeit gehabt die letzte Aufgabe, die qualitative Untersuchung auszuführen, hoffe aber später darauf zurückzukommen.

Um die herausdiffundierten Enzymmengen etwas genauer quantitativ zu bestimmen, habe ich die Metode MALFITANOS (1900) erwählt und zwar aus mehreren Gründen. Erstens sind nämlich durch diese Methode selbst minimale Mengen eines Enzyms nachweisbar, weil die enzymhaltende Flüssigkeit mit der Gelatine innig vermischt werden kann. Dann ist auch die Methode durch ihre Genauigkeit und Einfachheit besonders für eine Arbeit mit zahlreichen Proben gut verwendbar.

Es wurde nun eine Reihe von Mucorineen auf Peptonlösung kultiviert und zwar in zwei Serien A und B. Die Serie A wurde schon nach 5 Tagen abgebrochen, und die Nährflüssigkeit untersucht, die Serie B dagegen erst nach 10 Tagen.

Versuch Nr. 28.

Erlenmeyerkolben mit je 50 Cm^3 Nährlösung: 3 % Pepton und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur 20^0 C. Ohne Lichtzutritt.

In der Serie B wurde nach 10 Tagen gefunden:

	Wachstum	Nessler	Oxalsäure (mit Ca-Acetat und Eisessig)
M. Mucedo	×××	×	o
M. strictus	×××	××	o
M. flavus	×××	×	o
M. sphaerosporus	×××	×	o
M. racemosus	××	×	o
M. genevensis	××	××	o
M. hiemalis	×××	××	o
M. spinosus	×××	××	o
M. silvaticus	×××	××	o
M. stolonifer	×××	×	o
M. nodosus	×××	×	o
Abs. Orchidis	×××	×××	×××
Abs. cylindrospora	×××	×××	×××

Der Versuch zeigt also zuerst, dass sämtliche Arten mit Pepton als einzige organische Substans gut herauskommen. In diesen Peptonkulturen sind dann schon nach 5 Tagen (wie Serie A zeigte), noch mehr aber nach 10 Tagen, bedeutende Ammoniakmengen abgespalten. Endlich zeichnen sich auch hier die *Absidia*-Arten durch ihre reichliche Oxalsäurebildung aus.

Es wurde nun sowohl in Serie A mit 5 Tage alten Kulturen, wie in Serie B mit 10 Tage alten Kulturen, die Nährflüssigkeit auf proteolytischen Enzymen mit Gelatine geprüft. Zur Darstellung der Gelatine wurden von gewöhnlicher, guter Gelatine 100 Gram in 500 Cm^3 Wasser gelöst, und diese 20 prozentige Lösung darauf zweimal bei 100^0 C. in 15 Minuten sterilisiert, dann 2 $^0/_0$ Toluol zugesetzt, in Portionen von 5 Cm^3 auf sterilen Reagensgläser gefüllt, und endlich nochmals 15 Minuten auf 100^0 C. erhitzt. Darauf wurde nun von jeder der Kulturen in den oben erwähnten Serien A und B 5 Cm^3 Nährlösung in den Reagensröhren mit der Gelatine gut vermischt, wodurch die Gelatinlösung also 10 prozent. wurde, und dann in Thermostaten bei 37^0 C. gesetzt.

Um nun die Verflüssigung dieser 10 prozent. Gelatine verfolgen zu können, wurden die Gläser dreimal am Tage (morgens, mittag und abends) herausgenommen, in kaltes Wasser gezetzt und hier bei einer Temperatur von 15^0 C. genau 15 Minuten gehalten, und erst dann wurde untersucht, ob die Gelatine starr oder verflüssigt war. Als verflüssigt wurde hierbei die Gelatine nur angesehen, wenn sie nach dem Verlaufe dieser Zeit noch

vollständig dünnflüssig war; halbflüssige oder nur zähe Gelatine wurde wieder in den Thermostaten gesetzt.

In der folgenden Tabelle ist nun sowohl für Serie A wie B die zur Verflüssigung nötige Zeit in Stunden angegeben.

Versuch Nr. 29.

Die zur Verflüssigung von 10 Cm³ 10 % Toluol-Pepton-Gelatine (5 Cm³ 3 % Peptonnährlösung + 5 Cm³ 20 % Toluol-Gelatine) nötige Anzahl Stunden.[1]

	A Von 5 Tage alten Kulturen	B Von 10 Tage alten Kulturen
M. nodosus	30 Stunden	10 Stunden
Abs. Orchidis	156 —	15 —
Abs. cylindrospora	700 —	19 —
M. silvaticus	480 —	24 —
M. hiemalis	280 —	44 —
M. genevensis	Keine Verflüssigung nach 700 Stunden (= ca. 29 Tagen)	44 —
M. spinosus		68 —
M. racemosus		170 —
M. stolonifer		384 —
M. sphaerosporus		384 —
M. Mucedo		432 —
M. flavus		580 —
M. strictus		Keine Verflüssigung nach 580 Stunden (= ca. 24 Tagen)

Die einzelnen Arten verhalten sich also in Peptonkulturen mit Rücksicht auf Produktion von proteolytischen Enzymen überraschend verschieden. Nach 5-tägiger Kultur sind nur bei 5 Arten messbare Mengen eines gelatinlösenden Enzyms gebildet, bei den 8 anderen dagegen sind sie äusserst klein oder keine. In den 10 Tage alten Kulturen ist die gelatinlösende Fähigkeit der Nährlösungen sehr viel grösser und selbst bei *M. strictus*, wo nach 24 Tagen noch kein vollständiges Lösen eingetreten ist, ist die Gelatine doch ziemlich weit gespalten, was sich durch ihr spätes Erstarren zeigt.

Es wäre nun von besonderem Interesse diese Verschiedenheit in Produktion von proteolytischen Enzymen etwas näher zu studieren, vor allem unter Verwendung von verschiedenen Eiweissverbindungen als Nährstoff die gebildeten Enzyme auch qualitativ zu untersuchen. Ich hoffe später

[1] Sämtliche Zahlenangaben sind Mittelwert von 2 Parallelversuchen, die von einander höchstens um wenige Stunden differieren.

hierauf wieder zurückkommen zu können und werde daher von diesem einzelnen Versuch keine weiteren Schlüsse ziehen. Nur mag aber hier folgendes erwähnt werden. Zur Spaltung des Peptons, ein Prozess den die Pilze natürlich vornehmen müssen, um sich davon ernähren zu können, ist gar kein Enzym von der Natur der Peptase nötig, vielmehr genügt hier ein Ereptase-artiges Enzym (wie es ja schon mehrmals auch in Pflanzen gefunden ist) um den Abbau des Peptons zu bewirken. Es ist daher möglich, dass dieser Versuch derart zu erklären sei, dass einige der geprüften Mucorineen, wie z. B. *M. strictus*, bei Peptonernährung hauptsächlich nur Ereptase produziert und deshalb ihre Kulturflüssigkeit die Gelatine nicht löst, andere Arten dagegen wie *M. nodosus* bei Peptonernährung entweder nur Peptase oder wahrscheinlicher sowohl Peptase wie Ereptase bilden und daher die Gelatine angreifen. Ob sich diese Erklärung des einzelnen Versuches bei weiter fortgesetzten Versuchen stichhaltig zeigen wird, muss dann bis auf weiteres dahin gestellt werden.[1]

8. Hippursäure.

Über die Verarbeitung der Hippursäure $C_6H_5COCHNH_2COOH$ durch Pilze liegen, soweit es mir bekannt ist, nur äusserst wenige Erfahrungen vor.

In seiner Pflanzenphysiologie (Bd. I, p. 442) erwähnt PFEFFER kurz, dass die Pilze aus Hippursäure die Benzoesäure intakt abspalten. Dasselbe wird auch von NIKITINSKY (1904) behauptet, indem er meint, dass Hippursäure in Glykokoll und Benzoesäure gespalten wird, und die letztere dann, entweder in kohlenstoffarmen Nährlösungen weiter verarbeitet, oder in Zückerlösung vollständig geschützt und intakt gelassen wird.

Bei meinen eignen Untersuchungen über die Hippursäureverarbeitung habe ich teils mit Lösungen der freien Säure, teils mit ihrem Natriumsalz gearbeitet. Die Hippursäure selbst ist nämlich in Wasser äusserst wenig löslich und lag daher selbst in nur 1 prozentigen Lösungen als Kristalle auf dem Boden des Gefässes, und um dieser Schwierigkeit zu entgehen, wurde dann ihr Natriumsalz verwendet. Hierbei wurde immer 1 Gram krystallisierte Hippursäure in 100 Cm^3 0,224 $^0/_0$ Natronlauge unter kurzem Aufkochen gelöst und die dadurch gewonnene Natriumhippuratlösung dann die übrigen Nährstoffe zugesetzt.

Zuerst sollen hier die Versuche mit der freien Säure besprochen werden. In einem orientierenden Versuche mit einer Nährlösung von 1 $^0/_0$ Hippursäure als N-Quelle und 1 $^0/_0$ Glukose als C-Quelle und dazu

[1] Über die Trennung der pflanzlichen proteolytischen Enzyme in »peptonizing« Peptasen und »peptolysing« Ereptasen siehe die zahlreichen Abhandlungen von S. H. VINES.

den gewöhnl. Salzen wurde zuerst eine grosse Reihe von Arten geprüft. Hierbei zeigte es sich, dass sich hier überhaupt nur eine beschränkte Zahl entwickeln, und dass daher nur diese, im Ganzen 12 Arten, die Hippursäure angreifen können.

Bei den übrigen Versuchen wurden daher nur diese 12 Arten gezüchtet und bei diesen untersucht, wie sich die Verarbeitung der Säure abspielt. Als Beispiel mag hier der folgende Versuch dienen.

Versuch Nr. 30.

Erlenmeyerkolben mit je ca. 50 Cm³ Nährlösung: 1 % Hippursäure, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Die Azidität betrug vor dem Versuche ungefähr 7 Cm³ $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm³ einer filtrierten Probe der Nährlösung. Die Reaktion mit Nessler war 0, d. h. keine Spuren von Gelbfärbung.

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 16 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Azidität pro 10 Cm³ Nährlösung gemessen	Nessler	Geruch nach Benzaldehyd
M. racemosus	××	8,4 Cm³ $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	×	×
M. Christianiensis	×	8,0 —»—	×	×
M. sphaerosporus	××	6,2 —»—	××	×
M. dispersus	×	8,0 —»—	0	0—×
M. genevensis	×	7,1 —»—	××	××
M. griseo-cyanus	××	10,1 —»—	×	0
M. silvaticus	×××	6,2 —»—	××	××
M. spinosus	××	5,3 —»—	××	×
M. circinelloides	××	4,5 —»—	××	××
Zyg. Moelleri	×××	6,2 —»—	0—×	0—×

Das Wachstum ist also von recht verschiedener Stärke. Zwei Arten, *M. silvaticus* und *Zyg. Moelleri* zeigen gutes Wachstum (×××) und reichliche Fruktifikation, die anderen Arten dagegen gedeihen nicht besonders gut, obwohl auch die meisten von ihnen ziemlich grosse und dicke submerse Myzelmassen ausgebildet haben.

Mit Ausnahme von *M. dispersus* giebt die Nährlösung überall mit Nessler eine deutliche Ammoniakreaktion, die bei mehreren Arten wie vor allem bei *M. sphaerosporus, genevensis, silvaticus, spinosus* und *circinelloides* eine recht starke ist. Es wird also Ammoniak auf irgend eine Weise gebildet.

Die letzte Rubrik der Tabelle zeigt endlich, dass in den meisten Kulturkolben einen deutlichen Geruch nach Benzaldehyd gefunden wurde. Dieser Benzaldehydgeruch war in der Tat sehr stark, hatte den ganzen Thermostaten erfüllt und war auch schon von aussen durch die Ventilationsöffnungen leicht zu spüren. Dass der Geruch wirklich von Benzaldehyd bewirkt wurde habe ich nicht durch spezielle Reaktion untersucht, ich halte aber die Anwesenheit dieser Verbindung ohne weiteres durch ihren karakteristischen Geruch (wie Bittermandeln) bewiesen.

Was können wir nun aus diesen Tatsachen mit Rücksicht auf die Verarbeitung der freien Hippursäure schliessen?

Ohne Zweifel darf wohl angenommen werden, dass die Hippursäure erst eine Spaltung in ihren zwei Komponenten, Glykokoll und Benzoesäure, unterliegt. Darauf wird aber aus dem Glykokoll der Aminstickstoff als Ammoniak abgespaltet und findet erst als solches für die Eiweisssyntese Verwendung. Auch die frei werdende Benzoesäure unterliegt z. T. weiteren Veränderungen, indem sie wohl durch irgend eine Tätigkeit des Pilzprotoplasmas zu Benzaldehyd reduziert wird. Im Voraus haben wir ja schon bei mehreren Arten, und zwar eben meist bei denselben, denen es hier auch gilt, eine nitratreduzierende Fähigkeit gefunden, und es ist daher interessant zu sehen, dass auch hier eine Reduktion stattfindet.

Wie und unter welchen Bedingungen die Reduktion der Benzoesäure zu Benzaldehyd vorgeht, ist eine Frage, die sich nur durch eine Reihe von speziell angeordneten Versuchen untersuchen lässt. Es muss aber hier gleich bemerkt werden, dass diese Reduktion wahrscheinlich nicht stattfindet, wenn anstatt freier Hippursäure den Pilzen Natriumhippurat geboten wird. Allenfalls ist in keinem dieser Versuche der karakteristische Benzaldehydgeruch wahrnehmbar.

Von Interesse sind nun auch einige anderen Versuche, wobei, wie oben schon erwähnt, die Hippursäure in Form ihres Natriumsalzes den Pilzen geboten wurde. Da das Natriumsalz in Wasser leicht löslich ist, und dem Pilzorganismus daher zu jeder Zeit weit grössere Mengen disponible Nährstoffe zu Verfügung stehen als in den Versuchen mit der fast unlöslichen freien Säure war es möglich, dass auch andere Pilze als eben die 12 Arten, die mit freier Säure herauskamen, in solchen Lösungen gedeihen können. In einem orientierenden Versuche wurden daher die meisten von mir isolierten Erdboden-Mucorineen, im Ganzen 20 Arten, in einer Na-Hippuratlösung kultiviert. Es zeigte sich hierbei, dass eben die 12 oben erwähnten Arten gut keimten und nach 10 Tagen schöne Kolonien mit reichlicher Fruktifikation aufweisen konnten, während von den übrigen Arten nur äusserst kleine, mit unbewaffnetem Auge, kaum wahrnehmbare submerse Myzel-

bildungen zum Vorschein kamen. Es war also der Unterschied in Wachstum und weiterer Entwickelung zwischen den nicht hippursäureverarbeitenden Arten und denen, die diese Fähigkeit besitzen, ein absolut entscheidender. Jene zeigten fast gar keine Entwickelung, diese dagegen eine beinahe ausgezeichnete mit reichlicher Fruktifikation bei den meisten Arten. Ich führe hier einige der Versuche auf, um dann an diesen zuletzt einige Bemerkungen über die Art der Natrium-Hippuratverarbeitung knüpfen zu können.

Versuch Nr. 31.

Reagensgläser mit Nährlösung: 1 Gr. krystallisierte Hippursäure in 100 Cm^3 0,224 prozent. NaOH-Lösung unter kurzes Erwärmen auf 100^0 C. gelöst und dann die Lösung 1 $^0/_0$ Glukose und gewöhnl. Salze zugesetzt. Azidität vor der Infektion 1,8—2,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 der Nährlösung. Reaktion mit Nessler o—X, d. h. sehr schwache Gelbfärbung.

Temperatur 20^0 C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10 Tagen wurde gefunden:

<table>
<tr><th></th><th>Wachstum</th><th>Nessler</th></tr>
<tr><td>M. sphaerosporus</td><td rowspan="6">XXX</td><td>XXX</td></tr>
<tr><td>M. racemosus</td><td>XXX</td></tr>
<tr><td>M. Christianiensis</td><td>XXX</td></tr>
<tr><td>M. griseo-cyanus</td><td>XXX</td></tr>
<tr><td>M. spinosus</td><td>X</td></tr>
<tr><td>M. circinelloides</td><td>o—X</td></tr>
<tr><td>M. genevensis</td><td rowspan="3">XX</td><td>X</td></tr>
<tr><td>M. dispersus</td><td>XX</td></tr>
<tr><td>Zyg. Moelleri</td><td>o—X</td></tr>
<tr><td>M. stolonifer</td><td rowspan="2">X</td><td>o—X</td></tr>
<tr><td>M. nodosus</td><td>o—X</td></tr>
<tr><td>M. Mucedo</td><td rowspan="8">o—X</td><td rowspan="8">o—X</td></tr>
<tr><td>M. strictus</td></tr>
<tr><td>M. flavus</td></tr>
<tr><td>M. saturninus</td></tr>
<tr><td>M. hiemalis</td></tr>
<tr><td>Abs. Orchidis</td></tr>
<tr><td>Abs. cylindrospora</td></tr>
<tr><td>Abs. glauca</td></tr>
</table>

In dem folgenden Versuche wurde nur mit den mehr oder weniger wachsenden Arten experimentiert.

Versuch Nr. 32.

Erlenmeyerkolben mit 50 Cm³ Nährlösung: 1 Gr. krystallisierte Hippursäure in 100 Cm³ 0,224 % NaOH-Lösung unter Erwärmen gelöst, — dazu 1 % Glukose und gewöhnl. Salze.

Azidität vor dem Versuche 1,0 Cm³ $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm³ Nährlösung. Reaktion mit Nessler 0, d. h. keine Spuren von Gelbfärbung.

Temperatur 18—20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Azidität pro 10 Cm³ Nährlösung gemessen	Nessler
M. racemosus	×××	8,0 Cm³ $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	×××
M. Christianiensis	×××	12,2 —»—	×××
M. sphaerosporus	×××	4,1 —»—	××
M. griseo-cyanus	×××		××
M. silvaticus	×××	8,3 —»—	×
M. circinelloides	×××	0,4 —»—	0—×
M. spinosus	×××	neutral	0—×
M. genevensis	××	2,0 Cm³ $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$	×
M. dispersus	×	3,2 —»—	××
M. stolonifer	×		0—×
M. nodosus	×	8,1 —»—	0
Zyg. Moelleri	×	1,0 —»—	0—×
Kontrollkolbe (ohne Infektion)		1,0 —»—	0

Aus dem letzten Versuche geht hervor, dass mit Na-Hippurat als einzige N-Quelle nicht weniger als 8 Arten sehr gut gedeihen und durchaus normale Entwickelung zeigen (Wachstum ×× oder ×××). Hierzu kommen dann weiter 4 Arten, derer Entwickelung relativ weniger gut ist, jedoch aber so bedeutend, dass sie ohne Zweifel eine Verarbeitung der Hippursäure voraussetzt. Die übrigen Arten, die in dem vorletzen Versuche das Wachstumszeichen 0—× bekommen haben, zeigen eine so schlechte Entwickelung, dass eine Verarbeitung von dieser N-Quelle hier kaum in Betracht gezogen werden kann.

Die Verarbeitung des Na-Hippurats darf wohl in ihren Hauptzügen in derselben Weise wie die der freien Säure vorgehen. Allenfalls muss auch hier eine Spaltung der Säure in ihren Komponenten, Benzoesäure

und Glykokoll, stattfinden. Dass Benzoesäure wirklich entsteht, habe ich nicht durch genauere Untersuchungen für sämtliche Arten beweisen können, aber eine Mehrzahl der Kulturen gaben mit Bleiazetat eine wirkliche Fällung von Bleibenzoat. Hier ist zu bemerken, dass die Nährlösung schon im Voraus sehr kleine Mengen (0,05 %) $MgSO_4$ enthält und also immer mit Pb-Azetat eine deutliche Trübung (von $PbSO_4$) giebt, die sich durch Essigsäure nicht entfernen lässt. Bei ziemlich vielen Arten, besonders aber bei *M. Christianiensis*, traten nach beendigtem Versuche durch Zusetzen von Pb-Azetat zu der Nährlösung nicht nur die gewöhnliche Trübung von kleine Mengen von $PbSO_4$ Niederschlägen ein, sondern es bildeten sich auch grosse Massen eines weissen Niederschlages, der sich in Essigsäure leicht löste und daher aus Bleibenzoat bestand. Diese Fällung des Bleibenzoats war bei mehreren Arten so klein, dass sie sich von der $PbSO_4$ Fällung nicht unterscheiden liess, bei anderen Arten dagegen, so vor allem bei *M. Christianiensis* sehr kräftig und unzweideutig. Das Schicksal der abgespaltenen Benzoesäure darf daher vielleicht bei den verschiedenen Arten ein etwas verschiedenes sein. Wahrscheinlich wird sie bei mehreren Arten in irgend einer Weise weiter verarbeitet, bei anderen dagegen durch das Zucker mehr vollständig geschützt. Allenfalls scheint in diesen Versuchen mit Na-Hippurat kein Benzaldehyd zu entstehen, was vielleicht dadurch zu erklären ist, dass sich die Benzoesäure mit dem Natrium zu ihrem Na-Salz vereinigt hat und dadurch einer Reduktion entgeht.

Das abgespaltene Glykokoll unterliegt ohne Zweifel einer weiteren Verarbeitung, wobei Ammoniak und die entsprechende Oxysäure entstehen. Wie aus der Tabelle Nessler hervorgeht, zeigen nämlich von den 8 gut gewachsenen Arten nicht weniger als 4 eine starke Ammoniakreaktion (×× oder ×××) in der Nährlösung, 2 eine schwächere jedoch deutliche (×) und nur 2 eine sehr schwache (0—×). Dass die zwei letzten, *M. spinosus* und *M. circinelloides*, trotz ihres guten Wachstums nur eine unbedeutende Ammoniakreaktion zeigten, bietet für eine derartige Annahme keine Hindernisse. Denn natürlich können auch hier mit Rücksicht auf die Schnelligkeit im Verlaufe der verschiedenen Prozesse mehrere Abstufungen vorkommen und dabei vielleicht eben diese Arten das abgespaltene Ammoniak rascher verarbeiten, oder sie können auch die Spaltung der Hippursäure relativ langsamer bewerkstellen und also nur kleinere Mengen Glykokoll zur Disposition haben.

Auch bei der Verarbeitung von der Hippursäure oder ihren Salzen wird daher aus der abgespaltenen Aminosäure, Glykokoll, der Aminstickstoff als Ammoniak abgespaltet und darf wahrscheinlich erst als solches für die Eiweisssyntese Verwendung finden.

9. Allgemeines über die Stickstoffassimilation. — Resultate der Untersuchungen.

Über die Stickstoffassimilation der Schimmelpilze liegen bis jetzt recht zahlreiche und interessante Beobachtungen vor, und es fehlt dazu auch nicht an Theorien und verallgemeinernden Hypothesen, die sich den mehr oder weniger lückenhaften Thatsachen anschliessen. Es ist hier nicht die Stelle, eine allgemeine Übersicht von der Stickstoffassimilation der Eumyzeten zu geben, und eine Besprechung der wichtigsten Arbeiten auf diesem Gebiete ist um so mehr überflüssig, als sich eine zusammenfassende Darstellung von dem bis jetzt bekannten in jedem grösseren pflanzenphysiologischen Handbuch zu finden ist.

Es darf hier also nur erlaubt sein, im Anschluss an eine Resumé meiner eignen Beobachtungen einige Gedanken über die Erforschung dieses Problemes, wie sie bis jetzt betrieben ist, zu äussern und hierbei besonders die Wege, die bei der weiteren Arbeit hier eingeschlagen werden müssen, in aller Kürze zu diskutieren.

Wenn man sich mit der Erforschung einer biologischen Frage beschäftigt, wird es sich immer lohnen sich schon im Voraus über die Hauptzüge der Frage genau zu orientieren, um hierbei möglichst viele feste Pünkte auszufinden, an die sich dann die weiteren Untersuchungen knüpfen können. In dem vorliegenden Falle, also bei dem Studium der Stickstoffassimilation, oder wie es auch genannt wird, der Eiweisssyntese, haben wir nun zuerst nur einen festen Punkt, indem wir wissen, dass die Endprodukte der Assimilation die pilzlichen Eiweissstoffe sind, die das Protoplasma aufbauen. Die zwei Hauptfragen, die sich dann alsbald stellen, sind: Von welchem Materiale, d. h. von *welchen chemischen Verbindungen nimmt diese Syntese ihren Ausgangspunkt*, und welche *sind die chemischen Prozesse, die sich hierbei abspielen* und die *Zwischenprodukte*, die entstehen müssen, ehe wir das kompliziert gebaute Eiweissmolekul fertig gebildet haben.

Nehmen wir nun zunächst die erste Frage in Angriff, nämlich: welche Verbindungen sind für die Pilze die Ausgangsverbindungen der Eiweisssyntese — so liegen hier schon mehrere Schwierigkeiten vor. Zwar können wir wohl die Pilze in streng kontrollierbaren Nährlösungen kultivieren und ihnen also hier ausser einer Kohlenstoffverbindung beliebige Stickstoffquellen wie Nitrate, Ammoniumsalze u. s. w. bieten, und dann ermitteln, wie sie hiermit auskommen. Dies ist ein recht allgemeines Verfahren, und nachdem der einzelne geprüfte Organismus dann mit der einen oder anderen

Verbindung besser herauskommt als mit jeder anderen, wird er mit dem Namen dieser Verbindung belegt. Bekannt ist die Einteilung BEYERINCK's, wonach verschiedene Klassen wie: Nitrogenorganismen, Nitritorganismen, Nitratorganismen, Aminosäureorganismen u. s. w. aufgeführt werden.

Diese Einteilung scheint natürlich an und für sich bequem, sie bietet jedoch aber, wenn wir nach dem Ausgangspunkt der Eiweisssyntese fragen, eigentlich keine Vorteile und dies zwar hauptsächlich aus zwei Ursachen. Erstens ist es nämlich keine leichte Sache für einen bestimmten Pilz ganz allgemein zu sagen, dass er z. B. mit Nitraten besser herauskommt als mit anderen Verbindungen, denn in jeder Kultur spielen immer Stoffwechselsprodukte eine bedeutende Rolle, und diese sind dann wieder in Art und Menge von der gebotenen Stickstoffverbindung abhängig. Zweitens können wir nun in keiner Weise schliessen, dass ein Pilz, der z. B. mit Aminosäuren oder mit Nitraten am besten herauskommt, eben diese Verbindungen ohne jede Veränderung als die ersten Bausteine für das Eiweissmolekul verwendet.

Was nun der erste Punkt, die Ermittelung des besten Gedeihens betrifft, so sind hier hauptsächlich zwei Wege eingeschlagen worden. Meist wird der Pilz in Nährlösungen mit den zu untersuchenden Stickstoffverbindungen unter sonst völlig gleichmässigen Verhältnissen gezüchtet und nach bestimmter Zeit das gebildete Myzel abfiltriert, getrochnet und gewogen. Das grössere oder kleinere Erntegewicht wird dabei als Maasstab für den Nährwert der betreffenden Verbindung angenommen. Diese Methode ist die allgemeine und wurde z. B. von CZAPEK bei seinen umfangsreichen Untersuchungen angewendet.

KLEBS hat bei seinen Untersuchungen (Jahrb. f. wiss. Bot. 1899, Bd. 33) für *Saprolegnia* eine andere Metode angewendet. *Saprolegnia* hat nämlich, wie es wohl auch die meisten anderen Pilze haben, die Eigenschaft, bei schlechten Ernährungsbedingungen früher und schneller zur Sporangienbildung zu greifen, als wenn die Ernährungsbedingungen besonders günstig sind. Daher konnte also die Zeit, die verstrich, ehe Saprolegnia zur Sporangienbildung schritt, als Maasstab für den Nährwert des Substrates angewannt werden.

Beide Methoden sind allenfalls nur mit grosser Kritik anzuwenden. Sie zeigen uns nämlich nur den Nährwert der betreffenden Verbindung unter ganz speziellen Bedingungen und zwar eben die häufig höchst abnormen Bedingungen, die während des Versuches im Kulturkolben vorherrschen. In vielen Fällen haben daher diese Methoden, wie sie bis jetzt verwendet worden sind, zur Ermittelung von dem Nährwerte einer Stickstoffverbindung nur geringen Wert. Vor allem sind nämlich hierbei die Stoffwechsel-

produkte der Pilze nicht berücksichtigt worden, und es ist jedoch in der letzten Zeit mehrmals, besonders von NIKITINSKY (1904), darauf aufmerksam gemacht, dass die während des Wachstums gebildeten Stoffwechselprodukte auf die ganze Entwickelung und natürlich auch auf das Erntegewicht einen sehr starken Einfluss haben. Mit Stoffwechselprodukten werden dann nicht nur die eigentümlichen, noch unbekannten Stoffe gemeint, die von dem Protoplasma in kleinen Mengen gebildet werden, sondern auch die chemischen Verbindungen, die aus den gebotenen Nährstoffen durch Auflösen und Zerreisen des Molekuls entstehen, und die daher von grosser Bedeutung sind, weil sie in ziemlich grossen Massen angehäuft werden können.

Als Beispiele von Verbindungen, die zur Bildung solcher Stoffwechselprodukte Anlass geben können, sind besonders die Alkalinitrate und die Ammoniumsalze mehrerer anorganischen Säuren zu erwähnen. Wird z. B. *M. racemosus* in einer Glukose-Kaliumnitrat-Lösung kultiviert, so assimiliert er hieraus die Glukose, und dazu wird das Säureradikal NO_3 verarbeitet, indem der Pilz aus ihm seinen Stickstoffbedarf deckt. Während also das Anion NO_3 verarbeitet wird, findet das Kation K keine Verwendung und häuft sich in der Lösung als KOH auf. Hierdurch wird es bald zu einer schädlichen Konzentration von OH-Ionen kommen, die das Wachstum mehr oder weniger hemmend beeinflusst. Erst durch allmähliche Neutralisation dieser KOH durch vorsichtigen Säurezusatz wird mit dem KNO_3 als Stickstoffquelle der volle Nährwert erreicht. Dieser nachteilige Einfluss des Kations wird nun z. T. auch von dem Pilze selbst durch Bildung einer organischen Säure aus dem Zucker (gewöhnlich wohl Zitronensäure) aufgehoben und er vermag sich also regulatorisch zu schützen.

Weit ungünstiger sind aber die Verhältnisse, wenn dem Pilze (ausser Glukose) z. B. Ammoniumsulfat als N-Quelle geboten wird. In diesem Falle wird nur das Kation NH_4 verarbeitet und das Anion SO_4 intakt gelassen. Hieraus folgt dann eine recht beträchtliche Anhäufung von freier Schwefelsäure, und eine schädliche H-Ionen-Konzentration ist dann bald erreicht. Vor diesem Stoffwechselprodukt kann sich der Pilz nicht schützen, denn er vermag aus Glukose keine Base zu bilden, die zur Neutralisation dienen kann. Erst bei künstlich ausgeführter Neutralisation durch zugesetztes Kalziumkarbonat wird daher der volle Nährwert des Ammoniumsalzes ermittelt.

Hier mag auch der Harnstoff erwähnt werden. Aus dem Harnstoff werden von allen von mir geprüften Mucorineen und zwar wohl auch von anderen Pilzen wie *Aspergillus* grosse Mengen von Ammoniak oder Ammoniumkarbonat gebildet. Die Reaktion der Nährlösung wird hierdurch stark

alkalisch und hemmt hierdurch das Wachstum des Pilzes beträchtlich. Wenn daher von Czapek und anderen Forschern angegeben wird, dass dem Harnstoff als N-Quelle weit geringerer Wert zukommt als vielen anderen Stickstoffverbindungen, so sind die Ursachen hierzu zum grössten Teil in der durch Bildung von Ammoniumkarbonat herbeigeführten alkalischen Reaktion der Nährlösung zu suchen und hat wohl nichts mit der chemischen Konstitution des Harnstoffes im Vergleich mit anderen Verbindungen zu tun.

Selbst aber, wenn wir durch eine Reihe streng kontrollierter Versuche, wobei jede Wirkung schädlicher Stoffwechselprodukte neutralisiert worden ist, bewiesen haben, dass sich ein Pilz mit einer bestimmten Stickstoffverbindung viel besser herauskommt als mit jeder anderen, so ist es jedoch daher in keiner Weise erlaubt ohne weiteres zu schliessen, dass die betreffende Verbindung ohne jede Veränderung als Baustein im Eiweissmolekul eingeht.

Die beiden oben erwähnten Methoden, wobei man bei vergleichenden Kulturen durch Bestimmung des besten Wachstums versucht hat, den Ausgangspunkt der Eiweisssyntese zu ermitteln, versagen also im allgemeinen mehr oder weniger.

Es kommt mir daher vor, dass die Wege, die bei der Erforschung der Eiweisssyntese künftig eingeschlagen werden sollen, in einer etwas anderen Richtung gehen müssen. Weder durch Ausfinden des besten Wachstums noch durch Bestimmung des Eintrittes der Sporangienbildung, sondern nur durch Kulturversuche, die in jeder Hinsicht streng chemisch kontrolliert werden, dürfen wir eine Lösung der Frage erwarten. In möglichst einfachen und daher leicht kontrollierbaren Lösungen müssen die Schimmelpilze kultiviert werden, und hierbei muss dann jede Veränderung an den gebotenen Nährstoffen, jede Veränderung in der Reaktion der Lösung, jede neu entstehende Verbindung sowohl in der Lösung wie im Pilzmyzel mit chemischen Analysemethoden untersucht werden. Nur durch solche, in jeder Hinsicht chemisch kontrollierten Kulturversuche lässt sich mit Sicherheit etwas über die Wege der Eiweisssyntese schliessen. Natürlich sind solche Versuche nicht leicht ausführbar. Dem Botaniker versagt gewöhnlich die genügende Kenntnis zu den chemischen Analysemethoden und dem Chemiker die genügende Erfahrung über die Kulturmetoden und vor allem das Interesse für diese Sachen. Aber einmal müssen jedoch derartige Versuche ausgeführt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war von rein biologischer Art und die biochemischen Versuche sollten eine Übersicht über recht zahlreiche andere Umstände geben. Ich habe daher keine Gelegenheit gehabt die

Stickstoffassimilation und die Eiweisssyntese in allen Richtungen hin chemisch zu untersuchen, sondern nur einige spezielle Untersuchungen über einen einzelnen hierhergehörenden Moment ausführen können. Ich habe nämlich durch Kulturversuche auf mehrere verschiedene Stickstoffverbindungen die hierbei beobachtete Ammoniakbildung etwas näher untersucht. Zwar ist hier meistens nur einfach das Auftreten oder nicht Auftreten dieser Verbindung untersucht worden, aber das Heranziehen von einer ziemlich grossen Anzahl Arten bei den Versuchen hat eine nähere quantitative Untersuchung verhindert.

Es mag hier eine Übersicht meiner Versuche mit den gewöhnlichen Stickstoffverbindungen gegeben werden.

Mit Rücksicht auf der Assimilation der Nitriten und den Nitraten haben die Versuche gezeigt, dass nur eine beschränkte Anzahl der geprüften Arten diese Fähigkeit zukommt. Dabei ist aber den Nachweis gebracht, dass es eben dieselben Pilze sind, die Nitrate verarbeiten können wie die, die Nitrite verwenden und auch, dass die Entwickelung dieser Pilze mit den gewöhnlich als untauglich betrachteten Nitriten eine sehr gute ist und in alkalischer Lösung selbst den Nitratkulturen häufig in keiner Weise nachstehen. Ferner haben aber die Versuche gezeigt, dass in Glukose-Nitrat-Kulturen nach mehrtägiger Kulturdauer immer mehr oder weniger bedeutende Mengen von Nitrit und Ammoniak nachweisbar sind, und in den Kulturen auf Glukose-Nitrit-Lösungen wird in derselben Weise immer die Anwesenheit von Ammoniak konstatiert. Auch in dem Myzelium der auf Nitratlösungen gewachsenen Pilze sind bedeutende Mengen von Nitrit und Ammoniak nachgewiesen. Aus den Ergebnissen dieser Versuche darf daher geschlossen werden, dass sich die Assimilation der Nitrate und Nitrite höchst wahrscheinlich durch eine Reduktion dieser Verbindungen bis auf Ammoniak vollzieht, wobei bei der Nitratreduktion allenfalls Nitrit als Zwischenstufe auftritt. Die Nitrate und Nitrite finden daher erst als NH_3 für die Eiweisssyntese Verwendung, — eine Annahme die schon mehrmals wie z. B. von Laurent und Loew ausgesprochen worden ist, — und nur die Pilze, die im Stande sind, diese hoch oxydierten Verbindungen zu Ammoniak zu reduzieren, können dieselben für ihren Eiweissaufbau verwenden.

Für die Ammoniumsalze haben meine Versuche gezeigt, dass sowohl die anorganischen, wie $(NH_4)_2SO_4$ (hier doch erst nach Neutralisation der freigemachten Schwefelsäure durch $CaCO_3$), als die organischen Salze, wie äpfelsaures Ammon, gute Stickstoffquellen bieten, und dass also sämtliche geprüften Mucorineen im Stande sind, aus Ammonium ihre Eiweisssyntese zu beginnen.

Unter den Amiden sind Karbamid oder Harnstoff und Azetamid geprüft worden. Dabei hat sich gezeigt, dass Harnstoff als N-Quelle gut verwendbar ist, obgleich bei seiner Verarbeitung grosse Mengen von Ammoniumkarbonat gebildet werden, und so die Entwickelung der Pilze durch die hierbei entstandene ammoniakalische Reaktion allmählich gestört wird. Azetamid dagegen erlaubt keine oder nur äusserst schwache Entwickelung und ist daher nicht als N-Quelle verwendbar. Die Ursachen hierzu sind wahrscheinlich, dass die Mucorineen aus diesem Amid nicht Ammoniak bilden können, vielleicht wegen Mangel an einem hierzu dienenden Enzym. Das Verhalten dieser Mucorineen ist um so mehr interessant als durch andere Untersuchungen, besonders von CZAPEK für *Aspergillus niger*, das Azetamid als eine sehr gute Stickstoffquelle gefunden wurde.

Im Anschluss an Harnstoff wurde auch die Harnsäure untersucht. Diese Verbindung muss als eine sehr gute Stickstoffquelle angesehen werden. Betreffs ihrer Verarbeitung wird eine Bildung von Ammoniak und Kohlensäure über Harnstoff als Zwischenprodukt allgemein angenommen. Obwohl höchst wahrscheinlich konnte eine deutliche Ammoniakbildung jedoch nicht konstatiert werden, was wohl aber durch die sehr kleine Löslichkeit der Säure erklärt wird, indem nur verhältnismässig kleine Mengen zu jeder Zeit verarbeitet werden, und daher kein Überschuss an Ammoniak entsteht.

Die Hippursäure endlich ist für mehrere Arten eine ziemlich gute Stickstoffquelle. Bei ihrer Verarbeitung konnte Benzoesäure und Ammoniak nachgewiesen werden, und die Säure erleidet daher durch die Pilze eine Spaltung in ihre zwei Komponenten Benzoesäure und Glykokoll. Aus dem letzteren decken dann die Pilze ihren Stickstoffbedarf unter Abspaltung von Ammoniak.

Endlich sind dann die Aminosäuren zu erwähnen. Sie haben sich als vorzügliche Stickstoffquellen erwiesen und in 1 prozentiger Konzentration mit gleichzeitiger Zugabe von 1—2 % Glukose wird bei mehreren von ihnen eine so schöne und kräftige Entwickelung erzielt, wie es sonst nur Pepton-Glukose-Kulturen zeigen. Besonders gut sind Tyrosin und vor allem Leuzin, das in keiner Weise Pepton zurücksteht. Als gleichzeitige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle haben sie einen höchst variabelen Wert. Im Mittel genommen zeigt wohl Alanin hier die besten Resultate, dann aber auch Leuzin, obwohl die Entwickelung mit diesen beiden nur eine mässige ist und zudem sehr variirt, je nachdem man mit der einen oder anderen Mucor-Art experimentiert. Tyrosin ist in dieser Hinsicht besonders variabel. Einige wenige Arten wie *M. silvaticus*, *Abs. Orchidis*, *Abs. cylindrospora* und *Abs. spinosa* kommen mit 0,5 % Tyrosin als C- und

N-Quelle sehr gut heraus und zeigen schöne und kräftige Entwickelung, während viele andere wie *M. Mucedo, M. strictus, M. spinosus, M. stolonifer* u. s. w. keine oder äusserst unbedeutende Entwickelung zeigen.

Überall ist aber bei der Aminosäureverarbeitung, sowohl mit als ohne Zuckerzugabe, eine deutliche Ammoniakbildung nachweisbar, und die Aminosäuren verhalten sich also in dieser Hinsicht auf dieselbe Weise wie die übrigen geprüften N-Verbindungen.

Die Tatsache, dass bei der Verarbeitung von sämtlichen geprüften Stickstoffverbindungen, sowohl Nitrite und Nitrate, wie Amide und Aminosäuren, Ammoniak entsteht, kann natürlich auf verschiedene Weise erklärt werden.

So wäre es möglich, dass dieses Ammoniak durch einen Abbauprozess des Protoplasmas im Pilzorganismus selbst gebildet würde und also nichts mit der Stickstoffassimilation zu tun hätte. Indessen sind aber die gebildeten Ammoniakmengen so gross, dass eine derartige Erklärung ohne weiteres zu verlassen ist.

Dann ist aber weiter zu berücksichtigen, dass wir es hier mit einem für die Pilze karakteristischen Abbauprozess von stickstoffhaltigen Verbindungen zu tun haben können, einem Abbauprozess, den sie immer bewerkstelligen, der aber von der Stickstoffassimilation vollständig unabhängig und für diese sogar keine Notwendigheit ist. Eine solche Annahme von einer dissimilatorischen Fähigkeit, die in keinem Zusammenhang mit dem Aufrechthalten der Lebenprozesse steht, ist jedoch ziemlich unwahrscheinlich.

Wahrscheinlicher kommt es allenfalls mir vor, dass wir diesen Abbauprozess bei den Stickstoffverbindungen in Zusammenhang mit der Eiweisssyntese setzen können. Eine Annahme von einer Ammoniakbildung als notwendige Vorstufe für jeden Eiweissaufbau, wie sie schon von Loew (1890) ausgesprochen ist, kommt mir daher als die wahrscheinlichste Erklärung vor, und in der Tat darf wohl auch eine Bildung von der NH_2 Gruppe, wie sie in der für die Aminosäuren karakteristischen $CHNH_2$ Gruppe vorkommt, immer viele Vorteile bieten.

Eine Stickstoffassimilation durch Ammoniakabspaltung ist wohl aus Verbindungen wie Nitriten, Nitraten und Harnstoff recht wahrscheinlich. Denkbar wäre auch, dass aus Amiden und den niederen Aminosäuren wie Azetamid und Glykokoll, zuerst Ammoniak formiert werden muss; schwerer wird es aber, wenn wir uns vorzustellen haben, dass auch Asparagin, das bei den Umwandlungsprozessen von Stickstoffverbindungen in dem Pflanzen als häufiges Zwischenprodukt auftritt, auch einer Spal-

tung unterliegen muss, ehe es für die Stickstoffassimilation brauchbar wird.

Etwas noch komplizierter wird aber die Sache für die übrigen Aminosäuren wie besonders Leuzin und Tyrosin, die ja eben durch Hydrolyse aus dem Eiweissmolekul dargestellt worden sind. Es ist hier vielleicht notwendig in aller Kürze auf die vorliegenden Untersuchungen einzugehen.

Schon im Abschnitte über die Aminosäuren habe ich die interessanten Untersuchungen EMMERLINGS und CZAPEKS kurz erwähnt. CZAPEK nahm seinen Ausgangspunkt darin, was wir bis jetzt von der Eiweisshydrolyse wissen. Bei dieser entstehen nämlich zuerst Albumosen und Peptone, dann aus diesen Polypeptiden und durch ihre Zersprengung die Aminosäuren. Bei der weiteren Zerlegung wird nun aus ihnen der Aminstickstoff als Ammoniak abgespaltet. Trotz ihrer ziemlich einfachen Konstitution sind nun CZAPEKS Meinung nach die Aminosäuren als Produkte einer nicht sehr weitgegangenen Eiweissspaltung anzusehen; denn eben die Bildung von Aminosäuren resp. die Formierung ihrer sehr fest gebundenen Gruppe $CH . NH_2$ ist als der schwerste Punkt der Eiweisssyntese anzusehen und macht den Organismen die grössten Schwierigkeiten. Wenn erst aus Ammoniak und gewissen Kohlenstoffverbindungen diese karakteristische Gruppe der Aminosäuren gebildet worden ist, dann erfolgt durch ihre Verkettung zu Polypeptiden und weiter durch Peptone und Albumosen relativ leicht der Aufbau des Eiweissmolekules. In künstlichen Kulturen, wo den Pilzen fertige Aminosäuren geboten wurden, sollte ihnen also der schwerste Teil des Eiweissaufbaues erspart werden, und es wäre möglich, dass sie auf diese Verhältnisse mit sehr günstigem Wachstum reagieren.

Durch umfangsreiche Versuche mit Kulturen von *Aspergillus niger* auf verschiedenen Stickstoffverbindungen suchte nun CZAPEK ihren relativen Nährwert zu ermitteln. Hierbei wurde als Maasstab für die Eignung der verschiedenen Verbindungen das Trockengewicht des gebildeten Myzels verwendet. Die Resultate von diesen Untersuchungen waren, dass die Aminosäuren sehr hohe Ernten gaben und sich daher als vorzügliche Stickstoffquellen zeigten. Aus den Versuchen CZAPEKS kann aber eigentlich nicht geschlossen werden, dass eben die Aminosäuren für die Eiweisssyntese ein besonders guter Ausgangspunkt ist. Denn erstens sind eine Aminosäurelösung und z. B. eine Harnstofflösung in physiologischer Hinsicht nicht gleichwertige Lösungen, und zweitens kommt es mir vor, dass die Aminosäuren in den CZAPEKS'schen Versuchen gar nicht eine absolut dominierende Stellung einnehmen. Auf die schönste Weise geht nämlich aus seiner Tabelle p. 548 hervor, dass die Ammoniumsalze verschiedener Oxysäuren ebenso günstig ja in mehreren Fällen noch günstiger als

Aminosäuren wirken, und auch Verbindungen wie bernsteinsaures Ammonium und Azetamid zeigen sehr günstige Resultate.

Die Aminosäuren nehmen also eigentlich keine Sonderstellung ein, und wenn Czapek die gute Eignung der Oxysäuren daher erklären will, dass sie leicht in Aminosäuren überführt werden können, so ist hierzu nur zu bemerken, dass das Entgegengesetzte ebenso wahrscheinlich ist. Dies ist schon von Bennecke (Lafar: Handbuch) als eine sehr mögliche Annahme erwähnt, und meiner Meinung nach sprechen die meisten späteren Ergebnisse für eine derartige Auffassung.

Hier müssen dann auch die Beobachtungen von Emmerling (1902) erwähnt werden. Leider hat dieser Verfasser in seinen kurzen Mitteilungen seine Versuche so mangelhaft beschrieben, dass die Resultate für andere schwer zu berücksichtigen sind. Er meint allenfalls gefunden zu haben, dass meistens, jedoch nicht immer, nur die α-Aminosäuren gute Nährsubstrate sind, während β- und γ-Säuren nicht brauchbar sind. Eine Ausnahme macht jedoch die Aminobuttersäure, wo eben die γ-Säure sehr gutes Wachstum erlaubt, während die α-Säure keine Entwickelung giebt. Ausserdem wird auch kurz erwähnt, dass Tyrosin als Nährsubstrat vollständig unbrauchbar ist, und wenn von anderen Forschern das Entgegengesetzte angegeben wird, so soll dies nur auf Verunreinigung des Tyrosins beruhen. Wie oben erwähnt, hat Emmerling seine Versuche nur äusserst mangelhaft beschrieben. In seiner Abhandlung (Ber. d. d. chem. Gesellsch. Bd. 35 p. 2290) finde ich nur angegeben, dass er seine Kulturversuche auf hohlgeschliffenen Objektträgern in einem Tropfen, der den Aminosäuren und anorganischen Nährsalzen zugesetzt war, ausgeführt habe. Da also hier keine besondere Kohlenstoffverbindung erwähnt wird, darf wohl angenommen werden, dass eine solche nicht zugegeben ist, und dass also die Aminosäuren als gleichzeitige C- und N-Quelle gedient haben. Dann sind aber seine Versuche gar nicht mit den Versuchen anderer Forscher zu vergleichen, allenfalls nicht insofern sich diese über die Eignung der Aminosäuren als N-Quelle äussern. Wenn keine Kohlenstoffverbindung zugesetzt wird, stellt sich ja die Frage, ob der Kohlenstoffkomponent der betreffenden Aminosäure als Atmungs- oder Energiquelle dienen kann und gleichzeitig mit der $CH.NH_2$-Gruppe zur Eiweissaufbau verwendbar ist. Meine eignen Versuche mit Aminosäuren ohne Kohlenstoffverbindung zeigen, dass die Fähigkeit der Kohlenstoffverbindung in den Aminosäuren als Energiquelle zu dienen eine recht variable ist, und besonders von Tyrosin ist ja schon oben bewiesen, dass sich hier die einzelnen Arten recht verschieden verhalten, indem einige von ihnen auf ausschliesslich Tyrosin sehr gutes Wachstum zeigen, andere gerade nur auskeimen. Dies ist aber eine besondere Frage, eine Frage von

der Brauchbarkeit des Kohlenstoffkomponenten als Atmungs- oder Energiquelle, und hat nichts mit der Brauchbarkeit der Aminosäuren als Stickstoffquelle zu tun.

Besonders zu erwähnen sind die Beobachtungen von RACIBORSKI (1906) und BUTKEWITSCH (1903). Beide haben mit *Aspergellus niger* gearbeitet, und beide finden, dass jede Aminosäureverarbeitung von einer Ammoniakabspaltung begleitet wird.

Von grossem Interesse ist es auch, wie sich ABDERHALDEN in seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie (1906 — S. 235—36) über die Stickstoffassimilation und besonders die Aminosäureverarbeitung äussert. In einer speziellen Arbeit (1905) hat er schon die Eiweisssyntese des *Aspergillus niger* aus verschiedenen Stickstoffverbindungen untersucht und darauf aufmerksam gemacht, dass dieser Pilz sowohl aus Kaliumnitrat wie aus Glykokoll und anderen Aminosäuren sein Eiweiss in derselben Weise aufbaut. In drei Versuchsserien mit Kaliumnitrat, Glykokoll und Glutaminsäure baute der Pilz sein Eiweiss mit derselben Zusammenzusetzung von Aminosäuren auf — ganz unabhängig von der Art der ihm gebotenen Stickstoffquelle. So wurden in allen drei Serien im Pilze dieselben Aminosäuren wie Glykokoll, Alanin, Leuzin, Glutaminsäure und Asparaginsäure vorgefunden. Über die Weise, worauf diese Tatsachen zu erklären sind, sagt er zuerst: »Diese Erscheinung dürfte darin ihre Erklärung finden, dass dieser Pilz offenbar die ihm als Nahrung gebotenen Aminosäuren abbaut, vielleicht desamidiert, d. h. die Aminogruppe abspaltet und nun vom Ammoniak ausgehend den syntetischen Aufbau beginnt. Ganz in derselben Weise wird er sich aus dem Nitrat dieselben Grundsteine zu dem komplizierten Aufbau bilden.«

Diese Erklärung des Eiweissaufbaues, die hier gegeben wird, haben meine Versuche durchaus bestätigt. Die Ammoniakbildung ist ein durchgängiges Verhältnis, das bei der Verarbeitung aller von mir geprüften Verbindungen auftritt, und der Ausgangspunkt der Eiweisssyntese in Ammoniak wird daher aller Wahrscheinlichkeit nach als bewiesen anzusehen sein.

Zurück steht nur dann eine Erklärung von der angenommenen Überlegenheit der Aminosäuren zu geben. Denn wenn die Eiweisssyntese in Ammoniak ihren Ausgangspunkt nimmt, so sollten ja die Nitrate und Ammoniumsalze ebenso gut wirken wie Aminosäuren, da natürlich Ammoniak aus KNO_3 gebildet von denselben Eigenschaften ist, wie wenn es von Aminosäuren abgespaltet wird. Die Aminosäuren und die Nitrate sind daher bezüglich ihres Stickstoffes ungefähr von demselben Werte, und es bleibt nur noch die einzige Annahme, die Überlegenheit der ersteren durch die Eigenschaften ihres Kohlenstoffkomponenten, zu erklären.

Bedenken wir nun zuerst, dass ausser Aminosäuren auch die Ammoniumsalze mehrerer Oxysäuren sehr gute Stickstoffverbindungen und den meisten anderen Verbindungen ganz überlegen sind. Bei den Aminosäuren wird wohl die Gruppe $CH.NH_2$ in $CH.OH$ und NH_3 verwandelt, d. h. ausser Ammoniak entsteht bei ihrer Verarbeitung auch eine Oxysäure. Bei den oxysauren Ammoniumsalzen wird das Ammonium, NH_4, verarbeitet und es werden auch hier Oxysäuren frei. In beiden Fällen werden also Oxysäuren gebildet. Die Oxysäuren können natürlich auf vielerlei Weise günstig wirken, aber vor allem muss hervorgehoben werden, dass ihnen bei der Eiweisssyntese grosse Bedeutung zukommt, indem sie zusammen mit dem Ammoniak als Bausteine für die zahlreichen Aminosäuren, die in Eiweissmolekul eingehen, sehr brauchbar sind.

Es sind daher die günstigen Wirkungen der Aminosäuren als N-Quelle nicht durch eine direkte Anwendung der Gruppe $CH.NH_2$ zu erklären. Diese Gruppe wird verarbeitet, wobei NH_3 und $CH.OH$ entsteht, und die so gebildeten Oxysäuren sind es, die als gutes Baumaterial für zahlreiche andere Aminosäuren die Entwickelung des Pilzes begünstigen. In Übereinstimmung hiermit steht die Tatsache, dass auch die Ammoniumsalze vieler Oxysäuren als N-Quellen überlegen sind. Auch bei ihrer Verarbeitung werden Oxysäuren frei, und diesen kommen dann die günstigen Wirkungen zu.

Über die Art der Ammoniakabspaltung aus Amiden und Aminosäuren, Harnstoff und Hippursäure, ob sie von enzymatischer Natur sind oder nicht, liegen bis jetzt noch äusserst wenige Angaben vor. Da eine derartige Untersuchung ausser dem Rahmen dieser Abhandlung liegt, wird hierauf nicht näher eingegangen. Die Beobachtungen von SHIBATA (1904) und ausserdem diejenigen mehrerer Forscher auf dem tierphysiologischen Gebiete machen eine enzymatische Ammoniakabspaltung allenfalls sehr wahrscheinlich.

Kap. IV. Die Kohlenstoffresorption der Mucorineen.

1. Mehrwertige Alkohole, Mannit und Glyzerin.

Der Nährwert von diesen zwei Alkoholen wurde nur durch ein Paar Versuche mit Ammoniumsulfat als N-Quelle untersucht. Die Versuche haben durchaus negative Resultate ergeben und ich führe daher, ohne auf die Sache und die schon hier vorliegende Literatur einzugehen, nur einen der Versuche an.

Versuch Nr. 33.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung: 1 % Ammoniumsulfat, gewöhnl. Salzlösung, 0,75 % $CaCO_3$ und dazu

in Serie I — 1,5 % Glyzerin

» Serie II — 1,0 % Mannit.

Temperatur ca. 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach einer Kulturdauer von 15 Tagen war keine Spuren von Wachstum zu beobachten, weder in Serie I noch in Serie II. Die Arten, die bei diesem Versuche geprüft wurden und (unter diesen speziellen Versuchsbedingungen) also weder Glyzerin noch Mannit als C-Quelle verarbeiten können, waren die folgenden:

M. Mucedo	*M. spinosus*
M. strictus	*M. stolonifer*
M. sphaerosporus	*M. nodosus*
M. racemosus	*Abs. Orchidis*
M. Christianiensis	*Abs. cylindrospora*
M. hiemalis	*Abs. spinosa*
M. silvaticus	*Zyg. Moelleri*

Ich habe diesen Versuch hier nur aufgeführt um diese Verbindungen mit anderen Kohlenstoffquellen unter denselben Bedingungen vergleichen zu können. Übrigens wissen wir nämlich schon, dass die Verarbeitung der mehrwertigen Alkohole und besonders des Glyzerins in sehr hohem Grade von den Versuchsbedingungen, wie z. B. von gleichzeitig dargebotenen N- und C-Verbindungen abhängig ist, und die Resultate des obigen Versuches gelten also nur für die hier speziell gebotenen Kulturbedingungen (Ammoniumsulfat als N-Quelle und die Nährlösung durch $CaCO_3$ neutralisiert). Dass die Glyzerin- und Mannitverarbeitung von den gleichzeitig dar-

gebotenen Stickstoffverbindungen abhängig sein kann, hat ein Versuch gezeigt, wobei diese Verbindungen in 2 prozent. Konzentration als C-Quelle verwendet wurden und dazu als N-Quelle 1 % KNO_3 (anstatt des $(NH_4)_2SO_4$ wie im obigen Versuche).[1] Eine Verarbeitung des Mannits konnte hier nach 26 Tagen bei folgenden Arten konstatiert werden: *M. Christianiensis*, *M. spinosus*, *M. racemosus*, *M. sphaerosporus* und *M. griseo-cyanus*, und zwar war das Wachstum bei den zwei ersteren sehr gut, bei den drei letzteren nur ein mittleres. In demselben Versuche wurde eine Glyzerinverarbeitung bei: *M. griseo-cyanus*, *M. racemosus* und *M. Christianiensis* gefunden.

Warum eben eine Verarbeitung von diesen mehrwertigen Alkoholen in KNO_3-Lösungen z. T. sehr gut vorsichgeht, in $(NH_4)_2SO_4$-Lösungen dagegen nicht, darüber lässt sich vorläufig nicht entscheiden. Möglich wäre es allerdings, dass im ersten Falle der durch Verarbeitung der NO_3-Gruppe abgespaltene Sauerstoff die Alkohole in irgend einer Weise oxydiert und so eine Resorption ermöglich wird.

2. Disaccharide.

Auch über die Disacchariden und ihre Verarbeitung sind wir schon ziemlich gut orientiert, und meine eignen Untersuchungen sollten daher hier nur eine orientierende Übersicht über das Verhalten meiner Erdboden-Mucorineen geben, besonders ob sie mit ausschliesslich Disacchariden als C-Quelle wachsen können oder nicht. Es bedürfen wohl die Versuche nur einer kurzen Besprechung und für die umfangsreiche Literatur wird kurz auf die Handbücher hingewiesen.

In mehreren Versuchen wurde den Nährwert der Saccharose, Maltose und Laktose in Gegenwart von anorganischen Ammoniumsalzen untersucht. Die Versuche, die zu verschiedener Zeit aber unter sonst vollständig gleichwertigen Bedingungen ausgeführt wurden, sind in der folgenden Tabelle der Übersicht wegen als ein einziger Versuch zusammengestellt worden.

Versuch Nr. 34.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung: 1 % Ammoniumsulfat, gewöhnl. Salzlösung und

Serie I — 1 % Saccharose
Serie II — 1 % Maltose
Serie III — 1 % Laktose.

Temperatur ca. 20° C. Ohne Lichtzutritt.

[1] Auch wurde die Nährlösung hier nicht mit $CaCO_3$ neutralisiert.

Nach 10-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Wachstum		
	Serie I (Saccharose)	Serie II (Maltose)	Serie III (Laktose)
Abs. spinosa		XXX	
Abs. cylindrospora	XXX	XXX	
Zyg. Moelleri		XXX	
M. stolonifer		X	
M. racemosus	XX	XXX	
M. dispersus		X	
M. flavus		XX	
M. genevensis		XX	
M. strictus		XX	
M. Mucedo		XX	o–X
M. Christianiensis		XXX	
M. sphaerosporus		XX	
M. griseo-cyanus	o–X	XX	
M. saturninus		XX	
M. circinelloides		XX	
M. silvaticus		XXX	
M. spinosus		XX	
M. nodosus		XXX	
Abs. Orchidis		XXX	

Die Maltose ist also den anderen Disacchariden als Kohlenstoffquelle weitaus überlegen und gestattet in der Tat ein Wachstum, das Glukose-Kulturen nur wenig zurücksteht. Auf welche Weise die Verarbeitung stattfindet, habe ich nicht näher untersucht, aber eine Spaltung des Disaccharids in Glukose muss wohl vorausgesetzt werden.

Der Laktose dagegen kommt kein Nährwert zu. In sämtlichen diesen Kulturen haben die Pilze zwar gekeimt, sind aber fast ohne jedes Wachstum geblieben. Da die Laktose bei einer eventuellen Spaltung Glukose und Galaktose liefern sollte, von denen die erstere allenfalls als gute Kohlenstoffquelle verwendet werden konnte, so darf wohl angenommen werden, dass der Mangel an Fähigkeit Laktose zu verarbeiten dadurch bedingt wird, dass die Pilze das nötige laktosehydrolysierende Enzym, Laktase, nicht produzieren können.

Die Saccharose endlich nimmt zwischen Maltose und Laktose eine mittlere Stellung ein. Die meisten Arten können die Saccharose nicht verarbeiten, aber bei im Ganzen sechs Arten findet ein gutes Wachstum statt und hier muss also eine Verarbeitung vorausgesetzt werden. Von Interesse ist es, dass die zwei *Absidia*-Arten, *Abs. cylindrospora* und *Abs.*

spinosa mit Saccharose als einzige C-Quelle gut herauskommen, während *Abs. Orchidis* kein Wachstum zeigt. Auch *M. racemosus* und *M. Christianiensis* unterscheiden sich hier gut voneinander. *M. racemosus* zeigt ein ziemlich gutes Wachstum, während *M. Christianiensis* nicht zu Entwickelung kommt.

Über die Art und Weise, auf welche die Saccharoseverarbeitung durch die hier 6 aufgeführten Arten ausgeführt wird, lässt sich vorläufig nicht viel sagen. Für *M. racemosus* ist ja schon durch mehrere Untersuchungen bekannt, dass er eine Invertase produziert und also hier nach Inversion eine Verarbeitung stattfindet. Für *M. stolonifer* dagegen behauptet Butkewitsch, dass dieser Pilz kein Invertin produziert. Wenn daher der Pilz auf Rohrzucker mit anorganischen Ammoniumsalzen trotzdem ziemlich gut herauskommt, so meint er, dass dies nur durch eine von der freigewordenen Mineralsäure bewirkte Inversion des Rohrzuckers ermöglicht wird. Ob nun die aus Ammoniumnitrat oder -sulfat durch Assimilation des Ammoniums freiwerdenden Säuremengen wirklich im Stande sind, genügende Mengen von Rohrzucker zu invertieren, mag vorläufig dahin gestellt werden. Die Kulturversuche Butkewitsch's, wobei anstatt NH_4NO_3 das $(NH_4)_2(COO)_2$ verwendet wurde, schienen diese Annahme zu stützen, allenfalls wurde in diesen Kulturen keine Verarbeitung des Rohrzuckers beobachtet; eine Inversion durch die schwache Oxalsäure wäre ja nicht zu erwarten.

Es wäre von Interesse, eine Rohrzucker-Nährlösung nach beendeter Kultur mit der Fehlingschen Lösung zu untersuchen und ich habe daher einige Versuche mit grösseren Mengen Nährlösung vorgenommen. Als Beispiel mag der folgende Versuch dienen.

Versuch Nr. 35.

Erlenmeyerkolben mit je 50 Cm³ Nährlösung: 1 % Saccharose, 1 % Ammoniumsulfat und gewöhnl. Nährsalze.

Die Alkalität betrug vor dem Versuche 0,2 Cm³ $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm³ Nährlösung.

Temperatur 20° C. Ohne Lichtzutritt. (Siehe Tabelle Seite 105).

Dieser Versuch war in mehreren Hinsichten sehr interessant und ich habe ihn daher später nochmals wiederholt und zwar mit genau demselben Resultat. Wohl weichen die Zahlen für die Azidität mit einigen zehntel Kubikzentimetern auseinander, für die Reaktion mit Fehlings Lösung aber wurde genau das oben angegebene Verhältnis wiedergefunden. Es ist in der Tat höchst eigentümlich, dass einige Arten wie *Abs. spinosa* und *M. dispersus* so grosse Mengen von reduzierenden Körpern (Monosaccharide) bilden, während solche für die anderen Arten nicht nachweisbar sind. Die Nährlösungen von *Abs. spinosa* und *M. dispersus* bewirken,

Nach 9 und 19 Tagen wurde gefunden:

	Reduktion von Fehlings Flüssigkeit		Nach 19 Tagen	
	nach 9 Tagen	nach 19 Tagen	Wachstum	Azidität der Nährlösung pro 10 Cm^3 gemessen
M. racemosus	o	o	XX	4,0 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$
M. dispersus	XXX	XX	XX	3,4 —»—
M. stolonifer	o	o	XXX	4,2 —»—
Zyg. Moelleri	o	o	XXX	6,2 —»—
Abs. spinosa	XXX	XX	XXX	7,0 —»—
Abs. cylindrospora	o	o	XXX	4,2 —»—
Kontrolle (ohne Infektion)	o	o		0,2 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4

wenn sie kochender Fehlings Lösung zugetröpfelt werden, eine momentane Reduktion, während von den anderen selbst mehrer Cm^3 nach Kochen mit Fehlings Lösung keine Veränderung bewirken.

Es ist jedoch dieser Unterschied wahrscheinlich nur ein quantitativer. In sämtlichen Kulturen wird wohl die Saccharose gespaltet, jedoch ist die Inversion bei den meisten Arten eine so langsame, dass die Monosaccharide augenblicklich verbraucht werden. Nur bei *Abs. spinosa* und *M. dispersus* ist die Inversion so kräftig, dass einen bedeutenden Überschuss an Glukose und Lävulose entsteht. Diese beiden Arten stehen allenfalls mit Rücksicht auf Inversions-Fähigkeit weit über dem gewöhnlichen *M. racemosus* und sind daher für Untersuchungen über Pilzinvertase wahrscheinlich sehr zu empfehlen.

Von Interesse ist auch in diesem Versuche der grosse Unterschied in Inversions-Fähigkeit bei den beiden einander nahe stehenden Arten *Abs. spinosa* und *Abs. cylindrospora*.

Die Untersuchungen über die Verarbeitung von Disacchariden durch Erdboden-Mucorineen haben also gezeigt, dass Maltose als C-Quelle sehr verwendbar ist und von sämtlichen Arten mehr oder weniger stark angegriffen wird, während Saccharose nur von einer geringeren Zahl und Laktose von keiner der geprüften Arten verarbeitet wird.

Sämtliche Resultate gelten vorläufig nur für die oben angegebenen Kulturbedingungen, also mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle und ohne Zusatz von Kalziumkarbonat.[1]

[1] Wird Kalziumkarbonat in 0,75 % Konzentration zugegeben, so ist allenfalls für Saccharose keine Entwickelung der Pilze zu beobachten, wahrscheinlich weil die Invertase nur in der durch die freiwerdende Schwefelsäure bewirkten sauren Lösung zu arbeiten vermag und also durch die Neutralisation mit $CaCO_3$ vollständig in ihrer Wirkung gehemmt wird.

Es darf zuletzt darauf aufmerksam gemacht werden, dass meine Resultate für Laktose und Maltose vorläufig in direktem Wiederspruch mit den Beobachtungen LENDNERS stehen (1908 — p. 17). Bei seinen Kulturversuchen, die sich zwar auf andere Arten und auch andere Versuchsbedingungen beziehen, jedoch Mucorineen gelten, ist er eben zu dem entgegengesetzten Resultat gekommen, dass der Nährwert von Laktose ebenso gross oder auch grösser ist als von Glukose, während Maltose und Saccharose nur schlecht ernähren. Auf welchem Umstand dies beruht, weis ich nicht. Wie erwähnt hat LENDNER zum grössten Teil andere Arten verwendet und auch die Zusammensetzung seines Substrates (2 % »extrait de levure«, 1,5 % Agar und 5 % des betreffenden Zuckers) ist von der meinigen so abweichend, dass die Versuchsergebnisse auch eigentlich nicht vergleichbar sind.

3. Stärke.

Die Verarbeitung von Stärke, die ohne Zweifel von vielen, besonders den teknisch wichtigen Mucorineen ausgeführt wird, bedarf noch eingehender Untersuchungen. Wir wissen schon, dass zahlreiche Pilze die Stärke angreifen können, aber über die bei dieser Verarbeitung stattfindenden Veränderungen und besonders die Abhängigkeit der Stärkeverzuckerung von den gleichzeitig dargebotenen Kohlenstoffquellen ist unsere Kenntnis eine sehr lückenhafte. Hinsichtlich der letzten Frage, die Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle, beabsichtigte ich genauere Untersuchungen auszuführen; leider habe ich aber dazu keine Zeit gehabt.

Nur hinsichtlich der Stärkeverarbeitung bei Darbietung von ausschliesslich Stärke und anorganischen Ammoniumsalzen habe ich einige orientierende Versuche ausgeführt, die, ob sie nicht viel sagen, doch vielleicht hier angeführt werden mögen. Als Beispiel mag der folgende Versuch dienen.

Versuch Nr. 36.

Petrischalen mit Nähragar: 1 % Stärke, 1 % Ammoniumsulfat, gewöhnl. Nährsalze und 1 % Agar.

Temperatur 18—20° C. Ohne Lichtzutritt. (Siehe Tabelle Seite 107).

Wie der Versuch zeigt, kommen die Mucorineen mit Stärke als einzige C-Quelle äusserst schlecht heraus. Nur *M. circinelloides* und *M. saturninus* zeigen ein mehr bedeutendes Wachstum. Die übrigen haben meist nur sehr dürftiges Myzel gebildet oder die meisten nicht einmal gekeimt.

Die Bedingung für eine Diastaseproduktion ist vor allem gutes Wachstum, also muss den Pilzen ausserdem eine brauchbare C-Quelle

Nach längerer Kulturdauer wurde gefunden:

	Wachstum
M. circinelloides	××
M. saturninus	×
M. sphaerosporus	o—×
M. dispersus	o—×
M. racemosus	o—×
M. Christianiensis	o—×

M. Ramannianus	Wachstum o, d. h. Sporen nicht einmal gekeimt.
M. Mucedo	
M. strictus	
M. hiemalis	
M. silvaticus	
M. spinosus	
M. stolonifer	
M. nodosus	
Abs. Orchidis	
Zyg. Moelleri	

geboten werden, um genügende Entwickelung zu geben. Erst dann werden stärkespaltende Enzyme gebildet.

Dass unter diesen Bedingungen, d. h. einer mässigen Ernährung mit anderen Nährstoffen, Stärke verarbeitet wird, geht ohne weiteres von den zahlreichen Angaben über gutes Gedeihen auf gekochtem Reis hervor.

Übrigens soll hier nicht auf die Stärkeverarbeitung näher eingegangen werden, da meine Versuche hier zu wenig umfassend gewesen sind. Nur mag also präzisiert werden, dass mit Stärke als alleinige Kohlenstoffquelle und Ammoniumsulfat als N-Quelle keine oder äusserst geringe Verarbeitung der ersteren stattfindet.

Es sei hier übrigens noch erwähnt, dass unter diesen Bedingungen die Erdboden-*Penicillium* Arten gut herauskommen. So habe ich in dem obigen Versuche, wo die Mucorineen nicht oder nur sehr schlecht gewachsen waren, nach beendetem Versuche einige der Kulturschalen mit einem Erdboden-*Penicillium* (aus dem *Crustaceum*-Komplex) geimpft und dieser hat sich alsbald gut entwickelt.

Hierbei konnte schon ringsum den ganz jungen Kolonien eine starke Aufhellung des matt weissen Agars beobachtet werden, und nach einigen Tagen hatte sich diese Aufhellung mehrere Zentimeter von der Koloni aus verbreitet. Dies scheint also zu zeigen, dass der Pilz ein stärkeverzuckerndes Enzym in reichlichen Mengen von seinem Myzelium ausscheidet. Eine derartige Aufhellung war in keiner der Mucorineen-Kulturen zu sehen.

4. Inulin.

Die Verarbeitung dieser Polyose durch Schimmelpilze ist mehrmals studiert worden. So hat z. B. BOURQUELOT (1893 c) eingehend eine aus *Aspergillus niger* gewonnene Inulase studiert und auch DEAN (1903) hat dieser Inulase besonders mit Rücksicht auf ihre Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Weitere Angaben über pilzliche Inulinverarbeitung

finden sich dann bei GRÜSS (1902) für *Ustilago Maydis* und es scheint eben, als ob eine Inulinverarbeitung weder bei den Schimmelpilzen noch bei den Bakterien eine Seltenheit ist, während die Hefen andrerseits diese Polyose vollständig intakt lassen.

Für die Mucorineen liegen Beobachtungen über Inulinverarbeitung besonders bei den teknisch wichtigen, aus den Tropen oder Ost-Asien stammenden Arten vor.

Es interessierte mich daher, auch meine Erdboden-Mucorineen in ihrem Verhältnis zu Inulin zu prüfen.

Die hier ausgeführten Versuche haben bei den meisten Arten negative Resultate gegeben. Nur zwei Arten zeigen, wie aus dem folgenden Versuch hervorgeht, in Inulin-Kulturen ein mittleres oder gutes Wachstum.

Versuch Nr. 37.

Reagensgläser mit ca. 8 Cm³ Nährlösung: 1 % Inulin, 1 % Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$) und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur ca. 20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 20 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Reaktion mit Fehlings Lösung
Abs. cylindrospora	×××	keine
Abs. spinosa	××	keine
M. dispersus	×	keine
M. Mucedo	o – ×	
M. strictus	o – ×	
M. saturninus	o – ×	
M. flavus	o – ×	
M. sphaerosporus	o – ×	
M. racemosus	o – ×	
M. Christianiensis	o – ×	
M. hiemalis	o – ×	
M. genevensis	o – ×	
M. griseo-cyanus	o – ×	
M. silvaticus	o – ×	
M. spinosus	o – ×	
M. circinelloides	o – ×	
M. stolonifer	o – ×	
M. nodosus	o – ×	
Abs. Orchidis	o – ×	
Abs. glauca	o – ×	
Zyg. Moelleri	o – ×	

Das Inulin wird also ganz allgemein von diesen Mucorineen nicht verarbeitet. Nur drei Arten machen eine Ausnahme, indem sie mehr oder wenig gutes Wachstum zeigen; bei allen den anderen Arten dagegen haben die Sporen nur gekeimt, jedes Wachstum ist aber unterblieben. Von den drei gewachsenen Arten hat *M. dispersus* nur eine schwache, submerse Myzelentwickelung, während die beiden anderen, *Abs. cylindrospora* und *Abs. spinosa,* nach 29 Tagen gutes Wachstum mit sowohl submerses wie Luftmyzel zeigen. Jedoch ist die Entwickelung bei der ersteren deutlich besser als bei der letzteren. In der Tat war der Unterschied zwischen diesen zwei Arten nach nur 10-tägiger Kulturdauer ein bedeutend grösserer. *Abs. cylindrospora* zeigte da schon ein gutes Wachstum (×××) während *Abs. spinosa* nur erst gekeimt hatte, aber nicht weiter gewachsen war (Wachstum: 0—×). In den darauffolgenden 10 Tagen entwickelte sie sich jedoch gut und nach im Ganzen 20-tägiger Kulturdauer konnte also, wie die obige Tabelle zeigt, das Wachstum der zwei Arten mit ××× und ×× bezeichnet werden. In der Nährlösung konnte mit Fehlings Lösung keine reduzierende Monosaccharide (Fruktose) nachgewiesen werden.

Die meisten der geprüften Mucorineen können daher das Inulin nicht verarbeiten, wahrscheinlich weil sie keine Inulase produzieren können, ein Resultat, dass sich auch bei mehreren dieser Arten in anderen Versuchen mit KNO_3 als N-Quelle bestätigt hat. (Siehe Versuch Nr. 2).

5. Pektinsubstanzen.

Diese eigentümlichen Verbindungen, denen in der Natur eine weite Verbreitung zukommen, sind ja in chemischer Hinsicht noch äusserst wenig befriedigend bekannt. Es darf keinem Zweifel unterliegen, dass sie von Kohlenhydrat-Natur sind und durch Hydrolyse wirklich in einfache Monosen überführt werden können, aber hinsichtlich des Zustandes, in dem sie in den Pflanzen vorkommen, weichen die verschiedenen Angaben weit auseinander. Es ist hier nicht die Stelle, diese mehr chemische Seite der Frage zu besprechen, nur mögen die schönen Untersuchungen MANGINS (1892—93) erwähnt werden, wonach es die Pektose in Verbindung mit Zellulose die Zellmembranen der meristematischen Gewebe bildet, während die Pektinsäure als Kalziumsalz den Hauptbestandteil der Intercellularsubstans in parenchymatischem, nicht verholztem Gewebe ausmacht. Später sind dann von DEVAUX (1903) den Angaben MANGINS, insofern sie die Pektinsäure angehen, widersprochen worden. Nach diesem Forscher werden auch die Zellen der parenchymatischen Gewebe von einer Pektoseverbindung zusammengehalten.

Wie es hiermit nun auch sei, die Pektinsubstanzen sind allenfalls im Pflanzenkörper weit verbreitet und beanspruchen in mehreren Hinsichten unser besonderes Interesse. In grossen Mengen sind sie aus den Pflanzen nach Behandlung mit verdünnter Säure als Alkaliverbindungen extrahierbar, und wir können uns hierdurch für unsere Versuche das genügende Material herstellen.

Für meine vorliegenden Untersuchungen war es besonders von Interesse das Schicksal der Pektinkörper in dem toten Pflanzenmateriale etwas näher zu untersuchen, allenfalls insofern hier die Erdboden-Mucorineen eine Rolle spielen. Zu diesem Zwecke sollten erst Kulturversuche auf rein hergestellten Pektinkörpern angewannt werden, dann aber auch Versuche, wobei die Pilze an natürlich verwelkten Pflanzenteilen gezüchtet wurden. Leider sind nun, wegen Mangel an Zeit, nur die ersten Versuchsserien zur Ausführung gekommen.

Bevor aber diese Versuche näher besprochen werden, muss hier kurz auf die wichtigeren schon vorliegenden Arbeiten über die Pektinspaltung durch Pilze eingegangen werden.

Die Zersetzung der Pektinkörper hat besonders durch das Studium des Rotteprozesses von Flachs und Hauf bedeutende Fortschritte gemacht. Dieser Rotteprozess, wobei die Fasern der Flachs- und Hanfstengel in irgend einer Weise von dem übrigen Gewebe getrennt und die Zellen von einander frei gemacht werden, ist nichts anders als ein Auflösen von der hauptsächlich aus Pektinverbindungen bestehenden Mittellamellesubstanz. Auf welche Weise und durch welche Mittel dieses Aflösen bewirkt wird, war lange eine offene Frage, aber durch den Untersuchungen verschiedener Forscher wissen wir nun, dass bei dem in der Natur vorgehenden Rotteprozess immer Organismen, Pilze oder Bakterien, mitwirken, und dass ohne diese kein Erfolg bei dem Prozesse erzielt werden kann. Die über den Rotteprozess vorliegende Literatur ist schon viel zu gross um hier behandelt zu werden; es darf dies bezüglich auf die verschiedenen Handbücher (vor allem: Lafar: Handbuch d. tekn. Mykologie) hingewiesen werden. Hinsichtlich der Organismen, die bei der Rotte eine Rolle spielen, liegen mehrere z. T. einander wiedersprechende Beobachtungen vor.

Hauman hat (1902) bei der Rotte des Flachses eine ganze Reihe von Organismen isoliert, nämlich ausser 6 Bacillen, 1 *Streptothrix* und 1 *Micrococcus* auch die folgenden Pilze; *Penicillium glaucum*, *Cladosporium herbarum* und *Mucor Mucedo*. Hierzu kommen ausserdem sterile Myzelien mehrerer anderen Pilze. Durch künstlich ausgeführte Rotteversuche mit diesen Organismen meint er bewiesen zu haben, dass sie sämtlich auf Mittellamellesubstanz lösend einwirken. Dabei soll *Bacillus fluorescens*

den schönsten Rotteprozess geben, während die Pilze, die auf die Mittellamelle viel kräftiger einwirken als die Bakterien, nicht so günstig sind, da sie z. T. auch die Zellulose der Wände angreifen.

Durch künstliche Kulturen in einer Lösung, die ausser 1 % Pektin auch 0,1 % Pepton und 0,1 % Ammoniumphosphat und dazu anorganische Nährsalze enthielt, konnte die Zersetzung des Pektins auf polarimetrischem Wege nachgewiesen werden. Ausserdem verwendete Hauman auch ein Gelee von Kalziumpektinat. Dieses wurde von sämtlichen geprüften Arten verflüssigt, und hierbei zeigte *Aspergillus* und *Penicillium* unter den Pilzen, *Bac. fluorescens* unter den Bakterien, die grösste Verflüssigungsfähigkeit.

Die Resultate Haumans sind nun von späteren Forschern (Behrens — 1903) bestritten worden, allenfalls insofern es sich gezeigt hat, dass mehrere seiner Bakterien keine pektinspaltende Fähigkeit bezitzen.

Die Rotte des Flachses und Hanfes ist besonders von Behrens untersucht worden. Nach diesem können wir eine Wasserrotte, wobei das Material von Wasser bedeckt ist, und eine Landrotte, unterscheiden. Die Wasserrotte wird von Bakterien bewirkt und darf daher hier nicht besprochen werden. Die Landrotte dagegen, bei welcher noch zwischen Taurotte (im Herbst oder Frühling — also bei höherer Temperatur) und Winterrotte zu unterscheiden ist, wird häuptsächlich als eine Wirkung mehrerer Pilze angesehen. Unter diesen sind dann von Behrens als die eigentlichen Erreger des Prozesses zwei Mucorineen *M. hiemalis* und *M. stolonifer* isoliert worden. *M. hiemalis*, der eine sehr niedrige Temperaturgrenze besitzt, soll bei der Winterrotte, *M. stolonifer* dagegen bei der im Herbst und Frühling verlaufenden Taurotte, wirken.

Durch spezielle Versuche mit diesen Pilzen in Kulturen auf Mittellamellesubstanz und dazu 1 % Ammoniumsulfat und 0,5 % Dikaliumphosphat wurde erwiesen, dass sie die Pektinsubstanzen angreifen können, und auch in Kulturen auf künstlich dargestellten Pektinverbindungen wurde eine Spaltung konstatiert, wobei in mehreren Fällen Spaltungsprodukte nachgewiesen wurden, die Fehlings Lösung reduzierten.

Durch die Untersuchungen von Behrens war also eine pektinspaltende Fähigkeit sowohl bei *M. hiemalis* wie *M. stolonifer* nachgewiesen, und es schien mir daher von Interesse, auch die aus dem Erdboden isolierten Mucorineen zu prüfen. Bei diesen Versuchen wurde die Pektinverbindung als Pektinsäure meist aus Rüben oder Karotten, teils aber auch aus *Laminaria* hergestellt. Die Gewinnung der Pektinsäure geschah in der gewöhnlichen Weise durch Behandlung des zerkleinerten Pflanzenmaterials mit verdünnter Salzsäure und darauffolgendes Ausziehen mit einer verdünnten Ammoniaklösung. Nachdem die letztere gewirkt hatte, wurde abfiltriert,

und die gelbbraune Lösung in flachen Schalen zum Abdampfen des überschüssigen Ammoniaks bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann erst nach mehreren Tagen mit Kalziumklorid gefällt. Das gewonnene Kalziumpektinat wurde wieder mit verdünnter Salzsäure behandelt, wodurch das Kalzium in der Lörsung als $CaCl_2$ ging, und die freie Pektinsäure als geleeartige Substanz zurückblieb. Nach gründlichem Auswaschen des Kalziumklorids und der Salzsäure wurde endlich wieder abfiltriert, und die Pektinsäure nach mehrtägigem Trocknen bei gewöhnlicher Zimmertemperatur als eine harte, braune Substanz gewonnen.

Hier sollen nun erst einige Versuche besprochen werden, bei welchen die Pektinsäure als Na-Pektinat verwendet wurde.

Versuch Nr. 38.

Kultur in Petrischalen. 9 Gr. der reinen Pektinsäure in 600 Cm^3 0,66 $^0/_0$ Natronlauge gelöst. Dazu wurden 6 Gr. Ammoniumsulfat und gewöhnl. Nährsalze gesetzt, die Lösung kurz aufgekocht und in dünner Schicht in Petrischalen gegossen. Beim Abkülen bildete sich ein halbzähes Gelee, das nach mehreren Stunden ziemlich fest wurde.

Temperatur: Gewöhnliche Zimmertemperatur (15—18^0 C.). Ohne Lichtzutritt.

Bei diesen Versuchen, wobei also die Pektinsäure als Natriumsalz verwendet wurde, erstarrt immer die Nährlösung zu einer halbzähen Gallerte, ohne dass ich näher untersucht habe, wodurch dies bedingt wird. Wahrscheinlich ist aber das saure KH_2PO_4 unter den gewöhnl. Nährsalzen daran Schuld. (Siehe Tabelle Seite 113).

Von den 17 hier geprüften Arten kamen also 6 mit ausschliesslich Na-Pektinat als C-Quelle ziemlich gut heraus und zeigten ein mittleres Wachstum mit nicht unbedeutender Fruktifikation. Es können also diese Arten, *M. strictus*, *M. flavus*, *M. hiemalis*, *M. dispersus*, *M. nodosus* und *Abs. Orchidis* ohne Zweifel aus Pektinsäure ihren Kohlenstoffbedarf decken und besitzen daher die Fähigkeit Pektinsäure zu spalten. Unter den übrigen Arten zeigten nicht weniger als 9 ein deutliches Wachstum und können wahrscheinlich daher auch spaltend einwirken, obwohl die Spaltungsenergie in quantitativer Hinsicht bedeutend kleiner ist. Nur zwei Arten, *M. silvaticus* und *M. stolonifer* kommen mit Pektinsäure als C-Quelle gar nicht aus; der erstere zeigt nur sehr geringes Wachstum, und *M. stolonifer* hat nur eben hie und da gekeimt, ist aber ohne jedes Wachstum. Das Resultat für *M. stolonifer* steht also in offenem Widerspruch mit den Beobachtungen von BEHRENS, wonach eben *M. stolonifer* die Hauptrolle bei

Nach einer Kulturdauer von 20 Tagen wurde folgendes Wachstum notiert:

	Wachstum	Fruktifikation
M. strictus	××	×
M. flavus	××	×
M. racemosus	×	
M. Christianiensis	×	
M. hiemalis	××	×
M. sphaerosporus	×	
M. spinosus	×	
M. silvaticus	o—×	
M. dispersus	××	
M. circinelloides	×	
M. genevensis	×	Zygosporen
M. stolonifer	o	
M. nodosus	××	×
Abs. Orchidis	××	×
Abs. spinosa	×	
Abs. cylindrospora	×	×
Zyg. Moelleri	×	

der Taurotte zukommt und ausserdem in künstlichen Kulturen eine ausgesprochene Spaltung der Pektinsubstanz zeigt. Ich kann mir vorläufig hierauf keine absolut befriedigende Erklärung geben. Meine Reinkultur von *M. stolonifer*, die eben aus dem Erdboden isoliert wurde, hatte sowohl auf Na-Pektinat wie auf Ca-Pektinat gar keine Einwirkung. Es bleibt daher vorläufig nur die recht wahrscheinliche Annahme übrig, dass Behrens nicht mit *M. stolonifer* sondern mit *M. nodosus* gearbeitet hat. *M. nodosus* steht ja *M. stolonifer* in morphologischer Hinsicht sehr nahe und wurde erst vor 3 Jahren, also nach den Untersuchungen Behrens, von Namyslowski beschrieben. Nach meinen eigenen Erdbodenanalysen ist nun eben *M. nodosus* im kultivierten Erdboden sehr häufig vorkommend (viel häufiger als *M. stolonifer*), und da die obigen Versuche zeigen, dass *M. nodosus* eine recht beträchtliche Spaltungsfähigkeit zukommt, so darf es eigentlich keinem Zweifel unterliegen, dass Behrens mit *M. nodosus* oder mit einer diesem nahe verwandten Form gearbeitet hat. *M. stolonifer* lässt allenfalls die Pektinsäure vollständig intakt.

Bei dem obigen Versuche, der von mehreren anderen Versuchen bestätigt wurde, ist also bewiesen, dass Pektinsäure, die aus Rüben und Karotten gewonnen ist, von mehreren erdbewohnenden Pilzen verarbeitet wird. Es wurde auch versucht, in einigen der Kulturen Verbindungen

nachzuweisen, die Fehlings Flüssigkeit reduzieren; meistens aber hatten diese Versuche negativen Erfolg und nur in einzelnen Fällen wurden Spuren von Reduktion beobachtet. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass eventuell gebildete Monosen von den Pilzen augenblicklich verbraucht werden.

Zuletzt mag auch erwähnt sein, dass ich einen Versuch mit einem Pektinsäure-Präparat, das ich mir aus *Laminaria saccharina* herstellte, ausgeführt habe. Diese *Laminaria*-Pektinsäure wurde auf dieselbe Weise wie die oben beschriebene Karotten-Säure hergestellt und kam bei den Versuchen als Kalziumpektinat zu Verwendung. Es zeigte sich hierbei, dass die meisten Pilze nur äusserst schlecht oder gar nicht gediehen, und es ist daher wahrscheinlich, dass die aus *Laminaria* hergestellte Pektinsäure von derselben der Karotten und Rüben verschieden ist. Nähere Versuche hierüber habe ich jedoch nicht vorgenommen und erwähne die Sache hier daher nur vorläufig.

6. Xylan.

Nach EULER (Pflanzen-Chemie 1908) können wir die Hemizellulosen in zwei Klassen einteilen, je nachdem sie zwei verschiedenen biologischen Zwecken dienen. Zu der ersteren Klasse gehören dann die Reservekohlenhydrate, die in Samen, Sclerotien und Rhizomen vorkommen, meist also als Wandablagerungen in Speicherungsgeweben. Zu der zweiten Klasse gehören Hemizellulosen, die in biologischer Hinsicht eine ganz andere Rolle spielen, nämlich als Gerüstsubstanzen, denen eine mekanische Funktion zukommt. Sie bestehen nach EULER hauptsächlich aus Galaktanen und Pentosanen.

Eben diese Gerüst-Hemizellulosen gelangen natürlich mit dem toten Pflanzenmaterial in grossen Mengen in den oberen Erdschichten, und es schien mir daher von Interesse meiner Erdboden-Mucorineen in ihrem Verhältnis zu diesen Verbindungen etwas näher zu prüfen.

Als Versuchsobjekt wählte ich das in den Zellwänden von Holz in grossen Mengen vorkommende Xylan, das zu den Pentosanen gehört.

Zur Gewinnung des Xylans bediente ich mich der von THOMSON (Journ. pr. Chem. XIX) angegebenen Methode, und zwar wurde Sägemehl aus Birkenholz für die Darstellung verwendet. Das Sägemehl wurde 24 Stunden mit verdünntem Ammoniak behandelt und darauf gründlich ausgewaschen. Dann wurde das Material mit 5 % Natronlauge in geschlossenem Gefässe behandelt (gewöhnlich 24—48 Stunden) und darauf filtriert. Das Filtrat wurde mit Alkohol gefällt, und der Niederschlag mit Salzsäure, Alkohol und Äther gewaschen. Das dadurch gewonnene Xylan

hatte eine schwach braune Farbe und löste sich in kochendem Wasser zu einer Lösung, die in kaltem Zustand selbst in der verwendeten 1 prozentigen Konzentration schön opalisierend war.

Über Xylanverarbeitung durch Schimmelpilze liegen bis jetzt äusserst wenige Tatsachen vor.

Schornstein (1902) giebt kurz an, dass ein den Agaricineen angehöriger Holzpilz das Xylan im Holz von *Picea exelsa, Pinus silvestris* und *Fraxinus excelsior* verarbeitet und weist dies mittelst Polarisationsuntersuchungen nach. Auch für *Merulius lacrymans*, der nach den Angaben Hartigs (Lehrbuch d. Pflanzenkrankheiten 1900) das Xylan nicht angreifen soll, kommt er zu demselben Resultat. In Holz, das von *Merulius lacrymans* zerstört war, konnte er kein Xylan nachweisen, indem die Phloroglucin-HCl Reaktion negativ ausfiel.

Noch kürzer, aber ebenso interessant, sind die späteren Mitteilungen von Malenković (1905). Seine Untersuchungen hat er, wie er selbst sagt, »schlagwortartig zusammengefasst« und aus der zwei Seiten grossen Mitteilung lässt sich daher nur schliessen, dass das Xylan unter Mitwirkung von Organismen, Bakterien und Schimmelpilzen, einer lebhaften Störung unterliegt und zwar, wie der Verfasser selbst meint, viel rascher als Zellulose gespaltet wird. Über die Organismen, die hierbei mitwirken, fehlt in der Arbeit jede weitere Angabe.

Soweit es mir bekannt ist, liegt nichts weiteres über die Xylanverarbeitung vor, und da jedoch dieser Prozess in verschiedener Beziehung von grossem Interesse ist, habe ich einige meiner Mucorineen betreffs ihres Verhaltens gegen Xylan geprüft.

Zu diesem Zwecke wurde zuerst ein Versuch mit folgender Nährlösung ausgeführt.

Versuch Nr. 39.

1 % Xylan
1 % $(NH_4)_2SO_4$
Gewöhnl. Salze.

Der Versuch wurde in zwei Serien angeordnet. In der ersten Serie kam diese Lösung ohne weiteres zu Verwendung, in der zweiten wurde 0,75 % Kalziumkarbonat zugesetzt, um die aus dem Ammoniumsulfat allmählich freiwerdende Schwefelsäure zu neutralisieren. Beide Lösungen wurden darauf bei 100° C. sterilisiert und Kulturen in Reagensgläser angeordnet.

Hierbei zeigte sich in Serie I (ohne $CaCO_3$) keine Entwickelung der Pilze, in Serie II (mit $CaCO_3$) trat dagegen nach mehreren Tagen ein

obwohl kümmerliches Wachstum ein. Ich glaubte anfangs, das Xylan sei durch Einwirkung von dem Kalziumkarbonat in irgend einer Weise verändert worden, so dass es von den Pilzen verarbeitet werden konnte. Durch mikroskopische Untersuchung der Nährflüssigkeit zeigte es sich indessen, dass in der Serie II mit $CaCO_3$ sämtliche Kulturen von einem langen stabförmigen, sporenbildenden Bacillus verunreinigt waren. Dieser Bacillus hatte also in der neutralen Lösung der Serie II die Sterilisierung bei 100^0 C. im Dampfsterilisator überstanden und zeigte nun in der Xylanlösung lebhaftes Wachstum. Wahrscheinlich verarbeitet er das Xylan zu Xylose, und eben diese erlaubt dann die kümmerliche Pilzvegetation.

In einem späteren Versuche, wobei in Erlenmeyerkolben mit 50 Cm^3 der obigen Lösung kultiviert wurde und auch die zwei Serien mit und ohne $CaCO_3$ zu Verwendung kamen, waren durch längeres Sterilisieren vollständig bakterienfreie Kulturen erzielt. Bei diesem Versuche zeigte sich, dass keiner der geprüften Mucorineen in den Xylan-Ammoniumsulfat-Lösungen zu wachsen vermögen. Höchstens wird Keimung der Sporen beobachtet, aber jede weitere Entwickelung bleibt aus und zwar sowohl in der Serie mit $CaCO_3$ als in der ohne dieses Salz. Die folgenden Arten, die bei diesem Versuche verwendet wurden, können also Xylan nicht verarbeiten:

M. Mucedo	*M. spinosus*
M. racemosus	*M. nodosus*
M. hiemalis	*Abs. Orchidis*
M. dispersus	*Zyg. Moelleri.*
M. silvaticus	

Die Mucorineen können also weder die echte Zellulose (siehe diese) noch Hemizellulosen wie Xylan verarbeiten und unterscheiden sich dadurch scharf von vielen der gewöhnlichen Schimmelpilze. Als Beispiel dafür mag *Trichoderma* erwähnt werden. Wie in dem folgenden Kapitel über Zellulose angeführt, zeichnet sich *Trichoderma* durch ihre energische Zellulosespaltung aus und gedeiht z. B. auf Filtrierpapier mit Ammoniumnitrat sehr gut. Auch in der oben angegebenen Xylan-Ammoniumsulfat-Lösung habe ich eine *Trichoderma* züchten können. Der Pilz gedieh ausgezeichnet, hatte nach 20 Tagen die Nährlösung mit einem dicken »Myzelbrei« erfüllt und zeigte an der Oberfläche lebhafte Fruktifikation. Sowohl die Zellulose wie die Xylanzerstörung wird also von den *Trichoderma*-Arten ausgeführt und es ist wohl wahrscheinlich, dass es sich eben lohnen würde, die pilzliche Verarbeitung der verschiedenen Verbindungen aus der Zellulose-Hemizellulose-Gruppe im Anschluss an Kulturversuche mit

Trichoderma zu studieren. Wenn mir Zeit gegeben wird, hoffe ich bald auf eine derartige Untersuchung zurückzukommen.

7. Zellulose.

Durch recht zahlreiche Versuche ist schon der Nachweis geführt worden, dass mehrere Pilze im Stande sind, zellhautlösende Enzyme zu produzieren. Es wird hier natürlich nicht auf die Literatur im Einzelnen eingegangen, nur sind besonders die bekannten Beobachtungen DE BARYS für *Sclerotinia Libertiana* (1886) und MARSHAL WARDS für *Botrytis* (1888) erwähnt worden, wonach eine Ausscheidung von zelluloselösenden Enzymen bei den betreffenden Pilzen ohne Zweifel erwiesen wird.

Die Zersetzung der Zellulose im Erdboden ist natürlich ein Prozess, der unser besonderes Interesse beanspruchen wird und dann besonders insofern, als er durch die in saurer humöser Erde überall dominierenden Schimmelpilze ausgeführt wird.

Von besonders grossem Interesse sind hier die Untersuchungen ITERSONS (1904), wonach zahlreiche im Erdboden lebende Schimmelpilze im Stande sind, die Zellulose zu verarbeiten und durch sie ihren Kohlenstoffbedarf vollständig zu decken. Unter denen von ITERSON mit positivem Erfolg untersuchten Arten können besonders folgende erwähnt werden: *Mycogone puccinioïdes* (PREUSS) SACC., *Sordaria humicola* OUD., *Pyronema confluens* TUL., *Chaetomium Kunzeanum* ZOPF, mehre *Sporotrichum*-Arten, *Botrytis vulgaris* FR. und *Cladosporium herbarum* LK. und mehrere andere Hyphomyceten.

Sämtliche diese Arten kamen bei ITERSONS Versuchen in einer Lösung von Ammoniumnitrat als N-Quelle (und dazu kleine Mengen von KH_2PO_4), denen 2 $^0/_0$ schwedisches Filtrierpapier zugesetzt war, sehr gut zur Entwickelung, und es konnte nach beendetem Versuche konstatiert werden, dass sie die Fasern des Papiers sehr stark angegriffen und gelöst hatten.

Nachdem ich daher aus dem Erdboden eine Reihe von Mucorineen isoliert hatte, war es einer meiner ersten Versuche, ihr Verhalten Zellulose gegenüber zu prüfen. Im Voraus lagen eben für die Mucorineen äusserst wenige Angaben vor. KEAN (1890) hat für *M. stolonifer (Rhizopus nigricans)* bewiesen, dass dieser Pilz die Zellulose zu zersetzen vermag, und er meint auch, es sei ihm gelungen eine Enzymlösung zu gewinnen, die auf die Zellulose einwirkt.

Im Widerspruch hiermit stehen nun die Beobachtungen ITERSONS, wonach die Mucorineen und zwar eben *M. stolonifer* in den oben beschriebenen Kulturen auf Filtrierpapier nicht zu wachsen vermögen und daher wahrscheinlich kein zelluloselösendes Enzym produzieren.

Für einen anderen *Mucor*, — *Mucor hiemalis*, wird von Behrens in seinen Untersuchungen über die Taurotte angegeben, dass er die Zellulose nicht spaltet und eben dadurch bei der Rotte sehr günstig wirkt, indem er die Pektinstoffe der Mittellamelle auflöst, die Zellulose in den Zellwänden dagegen intakt lässt.

Meine eigenen Untersuchungen sind ausschliesslich als Kulturversuche auf Filtrierpapier ausgeführt worden. Es wurde zu diesem Zwecke teils in Petrischalen teils in Erlenmeyerkolben kultiviert und als Nährlösung diente eine 1 prozent. Lösung von Ammoniumnitrat oder Ammoniumphosphat, denen die gewöhnl. Mengen Nährsalze (0,05 % $MgSO_4$ und KH_2PO_4) zugesetzt waren. Besonders das Ammoniumphosphat hatte sich nämlich in Kulturen mit Glukose als eine ausgezeichnete N-Quelle erwiesen. Diese Lösung wurde dann ca. 2 % von dem gewöhnlich käuflichen Filtrierpapier zugesetzt und darauf reichlich mit Sporen infiziert.

Sämtliche Versuche haben durchaus negative Resultate gegeben. Keine der untersuchten Arten vermag die Zellulose in irgend nachweisbaren Mengen zu zersetzen. Im Folgenden werden deshalb nur einige der Versuche kurz beschrieben.

Versuch Nr. 40.

Petrischalen mit 2 Scheiben Filtrierpapier von 10 Cm^3 folgender Nährlösung durchträngt: 1 % $(NH_4)_3PO_4$ und gewöhnl. Salzlösung.

Zimmertemperatur: 15—18° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 14 Tagen wurde gefunden:

M. hiemalis	Auf den Scheiben zeigt sich niedrige, lockere Sporangienrasen. Unbedeutendes Wachstum.
M. silvaticus	Nur wenige, niedrige Sporangienträger. Höchst unbedeutendes Wachstum.
M. Ramannianus	Kein Wachstum.
Abs. glauca	Nur einzelne Hyphen hie und da kriechend. Unbedeutendes Wachstum.

Nach einer Kulturdauer von ca. einem Monate war noch keine weitere Entwickelung zu entdecken, trotzdem die Nährlösung mehrmals erneut wurde, und die anfangs gebildeten Sporangienträger waren auch verwelkt und umhergesunken. Bei mikroskopischer Untersuchung konnte keine Veränderung an den Papierfasern beobachtet werden; die Zellulose war daher wahrscheinlich vollständig unangegriffen. Dass sich einige der Pilze wie *M. hiemalis* trotzdem etwas entwickelten, geschah daher wohl nur auf Kosten des Sporenmaterials und möglicherweise sehr kleiner Mengen assimilierbaren Kohlenstoffverbindungen, die während der Sterilisation abgespalten wurden.

Zum Vergleich wurde auch eine aus dem Erdboden isolierte *Trichoderma*-Art unter denselben Bedingungen kultiviert; die hierdurch bewirkte Spaltung der Zellulose war sehr stark und leicht zu beobachten. Die Papierscheiben wurden unter den gut wachsenden Pilzkolonien hier vollständig gelöst, so dass sich bei der nach dem Versuche vorgenommenen Spülung mit Wasser zentimeterbreite Löcker in den Scheiben zeigten.

Für die Mucorineen haben sich nun in allen meinen Versuchen mit Zellulosespaltung nur negative Resultate ergeben. Teils sind hierbei andere anorganische Ammoniumsalze wie $(NH_4)NO_3$ verwendet, teils sind zu den Lösungen auch kleine Mengen Glukose (0,1 $^0/_0$) gegeben. Im letzten Falle entwickeln sich zwar die meisten Arten gut, eine Zersetzung der Papierfasern aber war mikroskopisch auch hier nicht zu entdecken.

Die Resultate meiner Versuche, wobei im Ganzen 15 der gewöhnlichen Erdboden-Mucorineen geprüft worden sind, bestätigen somit die Beobachtungen ITERSONS und BEHRENS, stehen dagegen, wie auch jene, in Widerspruch mit den oben erwähnten Beobachtungen von KEAN. Keine von meinen Arten, darunter auch *M. stolonifer*, vermögen die Zellulose in irgend welchen nachweisbaren Mengen zu zersetzen und sie unterscheiden sich also hierbei scharf von recht zahlreichen, gewöhnlichen Erdboden-Pilzen, die eine energische Spaltung bewirken.

8. Glukoside.

Über die Spaltung der Glukoside durch Schimmelpilze sind wir schon durch frühere Arbeiten besonders von BOURQUELOT (1893 a und b), PURIEWITSCH (1898) und BRUNSTEIN (1901) ziemlich gut orientiert, und es mag daher mit Rücksicht auf alle Einzelkeiten auf diese Abhandlungen hingewiesen werden. Dank diesen Untersuchungen wissen wir, dass die Glukoside unter Einwirkung von Pilzen in ihren zwei Komponenten, Glukose und ein Benzolderivat gespaltet werden, und dass dabei allenfalls die Glukose verzehrt wird. Über die Verarbeitung des Benzolderivates finden sich noch widerstreitige Angaben. Die Glukoside bieten aber eigentlich keine sehr guten Nährsubstanzen, und zwar dies hauptsächlich weil das abgespaltene Benzolderivat auf die Pilze schädlich einwirkt. Dies ist vor allem bei Salicin, Helicin und Arbutin der Fall, während bei Coniferin die Spaltungsprodukte unschädlich sind und daher eine gute Entwickelung gestatten. Die Glukosidspaltung ist übrigens eine recht variable und, wie BRUNSTEIN zeigt, vor allem von Alter und der Entwickelung des Pilzmyzeliums sehr abhängig. Ein stärkeres Myzel, durch gute Ernährung erzielt, spaltet die Glukoside viel schneller als ein schwacheres Myzel, das auf ungünstigem Nährsubstrate gewachsen ist. Dadurch wird erklärt, dass

die Glukosidspaltung in einer Kultur in hohem Grade von den zugleich gebotenen Nährstoffen abhängig ist.

Durch die oben angeführten Untersuchungen kennen wir also die Glukosidverarbeitung ziemlich gut, und es blieb mir daher bei meiner Arbeit, wenn nicht spezielle Einzelkeiten berücksichtigt werden sollten, zu konstatieren nur übrig, wie sich die Erdboden-Mucorineen hier verhalten.

Ich habe nur mit Salicin und Helicin gearbeitet. Zuerst wurde in einem Versuche untersucht, ob diese Glukoside als einzige Kohlenstoffquelle dienen können.

Versuch Nr. 41.

Reagensgläser mit je 8 Cm^3 Nährlösung: 1 % Ammoniumsulfat, 0,75 % Kalziumkarbonat und gewöhnl. Salzlösung. Dazu kam in

Serie I — 1 % Helicin
Serie II — 1 % Salicin.

Temperatur 18—20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 11 Tagen wurde gefunden:

In Serie I mit 1 % Helicin absolut kein Wachstum. Das Helicin vermag also nicht als einzige Kohlenstoffquelle zu dienen.

In Serie II mit 1 % Salicin dagegen konnte für mehrere Arten eine Verarbeitung des Glukosids konstatiert werden, — wie die folgende Tabelle zeigt.

<table>
<tr><th></th><th>Wachstum</th><th>Reaktion der Nährlösung mit $FeCl_3$</th></tr>
<tr><td>M. saturninus</td><td rowspan="8">X—XX</td><td rowspan="8">Violetfärbung (verschwindet durch Behandlung mit Äther oder Chloroform)</td></tr>
<tr><td>M. racemosus</td></tr>
<tr><td>M. sphaerosporus</td></tr>
<tr><td>M. Christianiensis</td></tr>
<tr><td>M. griseo-cyanus</td></tr>
<tr><td>M. hiemalis</td></tr>
<tr><td>M. silvaticus</td></tr>
<tr><td>M. spinosus</td></tr>
<tr><td>M. Mucedo</td><td rowspan="9">o oder o—X</td><td rowspan="9">Gelbfärbung</td></tr>
<tr><td>M. strictus</td></tr>
<tr><td>M. dispersus</td></tr>
<tr><td>M. genevensis</td></tr>
<tr><td>M. stolonifer</td></tr>
<tr><td>M. nodosus</td></tr>
<tr><td>Abs. Orchidis</td></tr>
<tr><td>Abs. spinosa</td></tr>
<tr><td>Zyg. Moelleri</td></tr>
</table>

Dem Salicin kommt also als Kohlenstoffquelle nur ein beschränkter Wert zu, wahrscheinlich weil das abgespaltene Benzolderivat schädlich auf das Wachstum einwirkt. Aus der Tabelle geht nämlich hervor, dass in sämtlichen gewachsenen Kulturen Spaltungsprodukte mit $FeCl_3$ nachweisbar sind. Man sollte erwarten, dass aus Salicin zuerst Saligenin entstehen sollte, und wahrscheinlich ist wohl auch dies der Fall. Da aber Saligenin mit $FeCl_3$ Blaufärbung giebt, und die Kulturen jedoch eine deutliche Violetfärbung zeigen, ist es wohl dadurch bewiesen, dass der primär gebildete Salicylalkohol (Saligenin) durch irgend eine oxydierende Tätigkeit der Pilze auf Salicylaldehyd oxydiert worden ist.

Von Interesse wäre es aber auch die glukosidspaltende Fähigkeit dieser Pilze bei guter Ernährung und kräftigem Wachstum zu untersuchen, und zu diesem Zwecke wurde der folgende Versuch angestellt.

Versuch Nr. 42.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung: 1 % Salicin, 1 % Glukose, 1 % Ammoniumsulfat, 0,75 % Kalziumkarbonat und gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur 18—20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 9 Tagen wurde gefunden:

	Wachstum	Reaktion mit $FeCl_3$
M. Mucedo	×× oder ×××	Spaltungsintensität ×× Starke Violetfärbung (Verschwindet mit Äther)
M. strictus		
M. flavus		
M. sphaerosporus		
M. racemosus		
M. Christianiensis		
M. dispersus		
M. hiemalis		
M. griseo-cyanus		
M. spinosus		
Abs. Orchidis		
M. saturninus	×× oder ×××	Spaltungsintensität × Violetfärbung (Verschwindet mit Äther)
M. silvaticus		
Abs. cylindrospora		
Abs. spinosa	××	Spaltungsintensität o—× Schwache blauviolette Färbung
M. stolonifer	o	Spaltung o Gelbfärbung
M. nodosus		

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, besitzen die meisten Mucorineen die Fähigkeit, Salicin zu spalten, wenn sie nur durch geeignete Nährbedingungen zu gutem Wachstum gebracht sind. Auch hier giebt die Eisenkloridlösung eine violette Färbung, die nur bei zwei Arten, *Abs. cylindrospora* und *M. silvaticus* etwas Blaues beigemischt ist. Da die Farbe ausserdem mit Äther oder Chloroform verschwindet, ist das abgespaltene Benzolderivat hauptsächlich als Salicylaldehyd zugegen. Auch hier wird also durch irgend eine Einwirkung der Pilze das primär abgespaltene Saligenin oxydiert. Eine weitere Oxydation des Salicylaldehyds ist in diesen Kulturen nicht beobachtet (nach 9-tägiger Kulturdauer). Nur bei *M. spinosus* war die violette Farbe weder durch Äther noch durch Chloroform völlig zum Verschwinden zu bringen. Es blieben immer einige Spuren der Farbe zurück. Vielleicht ist dies dahin zu deuten, dass, allenfalls bei dieser Art, eine allmäliche Oxydation des Salicylaldehyds zu Salicylsäure stattfindet. Es wurde jedoch dies Verhältnis nicht weiter untersucht.

Auch das eigentümliche Verhalten von *M. stolonifer* und *M. nodosus* verdient eine nähere Untersuchung. Es ist sehr auffallend, dass diese zwei nahe verwandten Arten durch den Zusatz von 1 % Salicin vollständig in ihrer Entwickelung gehemmt worden sind. Worauf dies beruht, ob es als Giftwirkungen des Glukosids zu betrachten ist, oder auf andere Weise erklärt werden kann, darüber vermag ich jetzt nicht zu entscheiden.

Endlich habe ich auch mit Helicin einen Versuch in einer Lösung von 0,5 % Glukose, 0,5 % Helicin und dazu als Stickstoffquelle 1 % Ammoniumoxalat vorgenommen. Der Versuch hat gezeigt, dass auch Helicin gespaltet wird, wenn erst die Pilze durch andere Kohlenstoffverbindungen (hier Glukose) in ihrer ersten Entwickelung ernährt werden. Die Spaltung war, nach der Reaktion der Eisenchloridlösung mit dem Benzolderivat zu beurteilen, meist eine langsame. Nach einer Kulturdauer von 18 Tagen wurde bei 13 Arten eine schwache Violetfärbung gefunden, bei 2 Arten, *M. spinosus* und *Abs. spinosa* eine mittlere starke, und bei *M. Mucedo* und *M. nodosus* endlich eine sehr starke, schön violette Färbung. Die Farbe verschwindet mit Äther gänzlich, und es ist also das hier primär abgespaltene Salicylaldehyd noch unverändert zugegen.

Weitere Untersuchungen über Glukosidspaltung durch die Mucorineen habe ich nicht ausgeführt. Die Versuche haben aber gezeigt, dass auch den erdbewohnenden Mucorineen eine glukosidspaltende Fähigkeit zukommen. Allerdings ist diese eine etwas beschränkte und kommt für die meisten Arten erst dann in Betracht, wenn die Pilze durch gute Ernährungsbedingungen in kräftiges Wachstum gebracht sind. Insofern

stimmen die Resultate mit den schon durch BRUNSTEINS Arbeit vorliegenden Erfahrungen.

9. Allgemeines über die Verarbeitung von Kohlenstoffverbindungen.

Als ich meine biochemischen Untersuchungen mit den Erdboden-Mucorineen in Angriff nahm, beabsichtigte ich besonders ihr Verhalten den vielen mehr oder weniger kompliziert gebauten Kohlenstoffverbindungen gegenüber zu bearbeiten. Je nachdem die verschiedenen Verbindungen zu den Versuchen herangezogen wurden, zeigte es sich indessen, dass sie nur in sehr beschränktem Masse von den Mucorineen verarbeitet werden, und dieser Teil meiner Aufgabe wurde daher, insofern sie meist nur zu negativen Ergebnissen führte, von weniger Interesse.

In der Tat sind die meisten Kohlenstoffverbindungen, die uns hier interessieren können, vor allem die, die im Erdboden vorkommen, den Mucorineen gegenüber auffallend widerstandsfähig.

Die verschiedenen Verbindungen, die hier untersucht wurden, sind vor allem: Mehrwertige Alkohole, Monosen, Disaccharide, Polyosen, Hemizellulosen, Zellulose und Pektinkörper.

Von den mehrwertigen Alkoholen wurden Mannit und Glyzerin geprüft. Mit Ammoniumsulfat als N-Quelle wurde von keinen der untersuchten Arten diese beiden Alkohole verarbeitet, und sie konnten also nicht als C-Quellen dienen. Etwas anders verhielt sich die Sache, wenn Kaliumnitrat als N-Quelle geboten wurde. In diesem Falle zeigten sich beide diese Verbindungen, jedoch nur für einige der nitratreduzierenden Arten, als Kohlenstoffquellen, obwohl nur von mittlerem Wert, die nur ein langsames Wachstum gestatten.

Unter den Monosen wird natürlich die Glukose energisch verarbeitet und gestattet in 1—1,5 prozentiger Konzentration gutes Wachstum. Auch die Lävulose wurde von den nitratreduzierenden Arten mit gutem Erfolg verarbeitet. Bei den übrigen Arten wurde sie nicht geprüft.

Schon bei den Disacchariden begegnen wir einer deutlichen Abnahme der Verarbeitungsfähigkeit. Nur die Maltose ist allgemein als gute C-Quelle anzusehen. Sie wurde von sämtlichen geprüften Arten verarbeitet und gab sehr gutes Wachstum selbst mit anorganischen Ammoniumsalzen (Ammoniumsulfat) als einzige N-Quelle. Die Saccharose dagegen kann nur bei einer sehr beschränkten Anzahl Arten als C-Quelle Verwendung finden, allenfalls wenn Ammoniumsulfat als Stickstoffverbindung geboten wird. Die Lactose endlich wird von sämtlichen geprüften Arten intakt gelassen und in Gegenwart von Ammoniumsulfat kommt ihr als C-Quelle kein Wert zu.

Von den geprüften Polyosen endlich erwies sich gewöhnliche Stärke als vollständig widerstandsfähig. Zusammen mit Ammoniumsulfat als N-Quelle wird sie von keinen der geprüften Arten angegriffen und kann daher nicht als C-Quelle dienen. Ungefähr ebenso unverwendbar ist Inulin. Diese Polyose wird von allen den geprüften Arten nur von *Abs. cylindrospora* und *Abs. spinosa* verarbeitet. Die erstere Art zeigt auf Inulin-Ammoniumsulfatlösungen gutes Wachstum, die letztere dagegen nur ein mittleres. Ausserdem findet auch durch *M. dispersus* eine kleine Inulinverarbeitung statt, aber für alle anderen Arten sind die Versuche negativ ausgefallen.

Als Repräsentanten für die Hemizellulosen ist Xylan geprüft worden. Obwohl dieses Pentosan zweifellos von mehreren Organismen, sowohl Bakterien wie Schimmelpilzen (z. B. *Trichoderma*) energisch angegriffen wird, haben sich auch hier die Erdboden-Mucorineen vollständig wirkungslos erwiesen.

Dasselbe gilt auch für die Zellulose, die in Form von Filtrierpapier geprüft wurde. Durch ITERSONS Untersuchungen ist bewiesen worden, dass gerade Filtrierpapier von recht zahlreichen Pilzen verarbeitet wird, was sich durch meine Versuche mit *Trichoderma* bestätigt hat. Auch hier fielen aber die Versuche mit Mucorineen negativ aus. Keine der geprüften Arten konnte mit Ammoniumsalzen als N-Quellen das Filtrierpapier zerstören.

Die Pektinkörper endlich, die als Pektinsäure geprüft wurden, erleiden wohl eine Zersetzung und können für mehrere Arten als Kohlenstoffquelle dienen, obgleich auch hier die Spaltung ziemlich langsam vor sich geht und auch weit von quantitativ verläuft. Allenfalls gestattet sie jedoch bei mehreren Arten ein mittleres Wachstum.

Aus den Versuchen geht also hervor, dass die Mucorineen, und besonders die erdbewohnenden Arten, auf die meisten der gewöhnlich als Kohlenstoffquellen verwendeten Verbindungen nur wenig energisch einwirken. Ein gutes Wachstum ist überhaupt nur mit Glukose (vielleicht auch den anderen Monosen) und Maltose erreichbar.

Dazu kommt dann Pepton, das als gleichzeitige C- und N-Quelle gute Entwickelung gestattet.

Im Allgemeinen sind aber die Kohlenstoffverbindungen den Erdboden-Mucorineen gegenüber sehr widerständsfähig, und diese Pilze sind für derartige Untersuchungen von geringem Interesse. Sie zeichnen sich hier so zu sagen durch eine grosse »Leckerhaftigkeit« aus.

Kap. V. Säurebildung bei den Mucorineen.

Über Säurebildung liegen bei den Mucorineen recht zahlreiche Beobachtungen vor; es soll jedoch hier nicht auf Einzelkeiten eingegangen werden. Die beobachtete Säurebildung ist meistens keine grosse und es handelt sich gewöhnlich nur um eine schwache Ansäuerung der Nährlösung, wahrscheinlich in den meisten Fällen durch kleine Mengen Oxalsäure oder Zitronensäure bewirkt.

Ich habe in der vorliegenden Arbeit keine systematische Untersuchung über Säurebildung bei meinen Erdboden-Mucorineen beabsichtigt und es dürfen in diesem Abschnitte daher nur einige gelegentliche Beobachtungen und orientierende Versuche besprochen werden.

Was nun zuerst die Oxalsäure betrifft, so wird diese bei den eigentlichen *Mucor*-Arten gewöhnlich nicht in nachweisbaren Mengen gebildet. Ganz anders verhält es sich dagegen mit den *Absidia*-Arten. Hier ist fast immer in Lösungen, die Glukose als C-Quelle enthalten, bedeutende Oxalsäuremengen mit Eisessig und Kalziumazetat nachweisbar. Ich habe die *Absidia*-Kulturen fast immer auf Oxalsäure geprüft und die Angaben hierüber finden sich in jedem Abschnitte. Hier soll nur ein Versuch besprochen werden bei dem vier *Absidia*-Arten geprüft wurden, und zwar mit Glukose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Stickstoffverbindungen.

Versuch Nr. 43.

Reagensgläser mit je ca. 8 Cm^3 Nährlösung:

Serie I — 0,5 % Glukose.
Serie II — 2,0 % Glukose.

Dazu 1 % folgender Stickstoffverbindungen:

a. 1 % Harnstoff. b. 1 % Glykokoll. c. 1 % Leuzin. d. 1 % Pepton »Witte«.

Ausserdem gewöhnl. Nährsalze.

Temperatur 18—20° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach 10-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Wachstum		Oxalsäure (mit Eisessig und Ca-Azetat)	
	Serie I (0,5 % Glukose)	Serie II (2 % Glukose)	Serie I (0,5 % Glukose)	Serie II (2 % Glukose)
a. 1 % Harnstoff				
Abs. Orchidis	×	×	××	××
Abs. glauca	×	××	××	××
Abs. spinosa	×	×	o—×	×××
Abs. cylindrospora	××	××	o—×	××
b. 1 % Glykokoll				
Abs. Orchidis	×	×××	×××	×××
Abs. glauca	×	×××	o—×	×××
Abs. spinosa	×	××	×××	××
Abs. cylindrospora	×	×××	o—×	×××
c. 1 % Leuzin				
Abs. Orchidis	××	××	×××	o—×
Abs. glauca	×××	×××	××	o
Abs. spinosa	×××	×××	o—×	o—×
Abs. cylindrospora	×××	×××	o	o
d. 1 % Pepton »Witte«				
Abs. Orchidis	×××	×××	×××	××
Abs. glauca	×××	×××	×××	××
Abs. spinosa	×××	×××	×××	×××
Abs. cylindrospora	×××	×××	×××	×

Ausserdem ist auch eine bedeutende Oxalsäurebildung in Kulturen mit 1 % Glukose und dazu 1 % Alanin oder Asparagin, und endlich auch in Kulturen mit ausschliesslich Pepton beobachtet worden.

Die Oxalsäurebildung der *Absidia*-Arten ist also eine recht konstant vorkommende und zudem eine ziemlich bedeutende. Mit Rücksicht auf ihre Abhängigkeit von den gebotenen Nährstoffen, können zwei Möglichkeiten vorliegen. Entweder ist sie aus die Kohlenstoffkomponenten der gebotenen Stickstoffquellen hervorgegangen, oder sie wird durch unvollständige Oxydation der gebotenen Glukose gebildet. Hinsichtlich dieser Frage liegen schon für *Aspergillus niger* mehrere Beobachtungen von EMMERLING (1903) vor. Wie andere Abhandlungen dieses Forschers ist auch die betreffende über Oxalsäurebildung so mangelhaft in ihren Angaben über die verschiedenen Versuchsbedingungen, dass es mir nicht möglicht ist, seine Ergebnisse selbständig zu beurteilen. In

Kulturversuchen mit *Aspergillus niger*, dem anorganisches Ammoniumsalz als N-Quelle und zudem verschiedene Kohlenstoffverbindungen geboten werden, findet er keine Oxalsäurebildung bei einer Reihe von Kohlenhydraten und mehrwertigen Alkoholen. In einer zweiten Serie von Versuchen wo dem Pilze Amide, Aminosäuren und andere Stickstoffverbindungen geboten werden, ist bei den Aminosäuren und besonders bei Pepton grosse Mengen von Oxalsäure nachweisbar. Nun finde ich aber in der Abhandlung keine Angaben darüber, ob in diesen Versuchen die Aminosäuren und das Pepton nur als Stickstoffquellen oder als gleichzeitige Stickstoff- und Kohlenstoffquellen gedient haben. Da keine besondere Kohlenstoffquelle erwähnt wird, ist wohl das letztere hier der Fall, es sind die Aminosäuren und das Pepton als gleichzeitige C- und N-Quellen verwendet worden und die Oxalsäure ist wohl aus ihnen durch unvollständige Oxydation ihres Kohlenstoffkomponenten gebildet.

Dasselbe kann bei meinen *Absidia*-Arten natürlich zu einem kleineren Teil stattgefunden haben; ich glaube aber, dass hier die Oxalsäure vorwiegend durch unvollständige Oxydation der gebotenen Glukose gebildet worden ist. Denn, wie aus der Tabelle hervorgeht, wird auch mit Harnstoff als N-Quelle Oxalsäure in bedeutenden Mengen formiert, und hier muss sie ja aller Wahrscheinlichkeit nach aus der Glukose stammen, da eine Umbildung des Harnstoffes in Oxalsäure wenig wahrscheinlich ist. Auch in den anderen Serien mit Aminosäuren und Pepton ist wohl daher die Säure hauptsächlich als ein unvollständiges Atmungsprodukt des Zuckers anzusehen; jedoch muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass in Versuch Nr. 28 mit Pepton als gleichzeitige N- und C-Quelle auch Oxalsäure auftritt. Eigentümlich ist es, dass mit Leuzin als N-Quelle in Serie II fast keine Oxalsäure gebildet wird.

Die gebildete Oxalsäure wird wohl z. T. wieder weiter oxydiert; es würde sich aber lohnen, einige Versuche anzustellen, wobei für ihre vollständige Bindung als Salz (entweder durch Ca oder andere Basen) gesorgt werden würde. Ohne Zweifel konnte bei Analyse derartiger Kulturen eine recht bedeutende Oxalsäurebildung bei den *Absidia*-Arten konstatiert werden.

Was nun die eigentlichen *Mucor*-Arten betrifft, so ist hier gewöhnlich keine Oxalsäurebildung nachweisbar. Dagegen wird die Nährlösung durch Produktion irgend einer organischen Säure häufig ziemlich stark angesäuert. Durch Titrierung ist, besonders wenn KNO_3-Glukoselösungen verwendet werden, häufig eine ziemlich hohe Azidität nachweisbar. In diesem Falle, wenn also KNO_3 als Stickstoffquelle geboten wird, erreicht die Azidität gewöhnlich nach 5—6 Tagen ihr Maximum und sinkt dann wieder, weil die Säure durch das freiwerdende K neutralisiert wird. Nach 14 Tagen haben

die Kulturen gewöhnlich eine neutrale oder mehr oder weniger alkalische Reaktion angenommen.

Um einige Zahlen für die Azidität geben zu können wird hier der folgende Versuch angeführt.

Versuch No. 44.

Erlenmeyerkolben mit je 50 Cm^3 Nährlösung: 1 % Kaliumnitrat, 1 % Glukose und gewöhnl. Salzlösung.

Alkalität vor dem Versuche: 0,3 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4 pro 10 Cm^3 Nährlösung (Indikator Kongorot).

Nach 5-tägiger Kulturdauer wurde gefunden:

	Azidität mit $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Nährlösung gemessen
M. racemosus	16,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$
M. Christianiensis	18,5 —»—
M. sphaerosporus	8,0 —»—
M. circinelloides	9,0 —»—
M. griseo-cyanus	12,5 —»—
M. spinosus	10,0 —»—
Mucor 153	11,5 —»—
Mucor 179, a	12,0 —»—
Kontrolle ohne Infektion	0,3 Cm^3 $\frac{n}{50}$ H_2SO_4

Die Azidität ist also bei mehreren Arten eine recht beträchtliche und beträgt in Maximum bei *M. Christianiensis* 18,5 Cm^3 $\frac{n}{50}$ $Ba(OH)_2$ pro 10 Cm^3 Nährlösung.

Über die Art der gebildeten Säure habe ich keine Untersuchungen gemacht, aber wahrscheinlich handelt es sich hier um Zitronensäure, die ja mehrmals bei anderen *Mucor*-Arten gefunden ist.

Kap. VI. Abhängigkeit des Wachstums von den Temperaturverhältnissen.

Bei den niederen Organismen sind Untersuchungen über die Abhängigkeit von der Temperatur bei verschiedenen Lebensfunktionen wie Wachstum und Fruktifikation aus mehreren Ursachen von besonderem Interesse.

Erstens können derartige Untersuchungen von mehreren Arten häufig gute diagnostische Merkmale dadurch liefern, dass die Temperaturkardinalpunkte bei den verschiedenen Arten mehr oder weniger von einander abweichen. Es ist mehrmals hervorgehoben worden, dass die Kardinalpunkte wie z. B. die oberen und unteren Grenzen des Wachstums in ziemlich hohem Grade von der Zusammensetzung des Substrates abhängig sind. Natürlich trifft dies bis zu einem gewissen Grade zu, jedoch glaube ich, dass, wenn erst das Substrat genügend gute Nährstoffe enthält, es von geringerer Bedeutung ist, von welcher chemischen Art die betreffenden Verbindungen sind. Wenn wir z. B. mit Arten zu tun haben, die sowohl Nitrate und Ammoniumsalze wie Aminosäuren und Pepton als N-Quelle verwenden können, dann ist die Zugabe der einen oder der anderen dieser Verbindungen mit Rücksicht auf eine Verschiebung von den Temperaturgrenzen des vegetativen Wachstums nur von geringer Bedeutung. Erst wenn wir Verbindungen anwenden, die auch unter günstigen Temperaturverhältnissen nur ein dürftiges Wachstum gestatten, z. B. bei Anwendung von Glyzerin oder vielen organischen Säuren als C-Quelle anstatt einer der Monosen, wird die Lage der Temperaturgrenzen bedeutender beeinflusst.

Es muss daher hervorgehoben werden, dass bei Bestimmung der Temperaturgrenzen eines Pilzes in erster Linie ein gutes Nährsubstrat verwendet werden muss, dann können ferner zur weiteren Diagnostisierung natürlich auch Versuche mit ungünstigen Nährverbindungen angewandt werden. Die Resultate aber, die mit gutem Nährsubstrat erlangt werden, besonders die Temperaturgrenzen für das vegetative Wachstum, sind vor allem zur Unterscheidung der einzelnen Arten von grosser Bedeutung.

Als »gutes Nährsubstrat« habe ich nun bei allen hier zu besprechenden Untersuchungen ein P e p t o n - G l u k o s e - S u b s t r a t benutzt und zwar jede

dieser Verbindungen in 1 prozent. Konzentration und dazu die in dem zweiten Kapitel dieser Abhandlung aufgeführte, »gewöhnl. Salzlösung«.

Eine genauere Untersuchung der Temperaturgrenzen mit Rücksicht auf eine dadurch zu erziehlende Unterscheidung der verschiedenen Arten habe ich nun eigentlich nicht vorgenommen. Jedoch zeigen schon die vorläufigen Untersuchungen mehrere interessante Beispiele. Der *Mucor nodosus,* der morphologisch dem *M. stolonifer* ziemlich nahe steht, unterscheidet sich z. B. von diesem durch seine hohe obere Temperaturgrenze 43—44^{0} C.; auf demselben Substrate gezüchtet hat nämlich *M. stolonifer* seine obere Grenze schon bei 33—34^{0} C., also nicht weniger als 10 Grad niedriger. Eine andere Art, *M. piriformis,* zeichnet sich durch eine sehr niedrige obere Grenze, ca. 25^{0} C., vor allen anderen von mir gezüchteten Mucorineen aus. Endlich mögen auch die zwei *Absidia*-Arten, *Absidia spinosa* Lendner und *Absidia cylindrospora* Hagem erwähnt werden. Die erstere von Lendner beschriebene Art, die sich durch einhäusige Myzelien auszeichnet, ist nach 16 Tagen bei 6—8,5^{0} C. nicht zum Wachstum zu bringen, während die zweihäusige, jedoch aber sehr nahestehende *Absidia cylindrospora,* zu dieser Zeit bei derselben Temperatur schon ziemlich gut wächst und ca. 1 Cm. breite Kolonien (Strichkulturen) mit viel Luftmyzel gebildet hat.

Eine Untersuchung von den Temperaturgrenzen hat aber zweitens eine grosse Bedeutung durch die hierbei gewonnene biologische Karakterisierung der Arten oder der Gesellschaften. Wir können nämlich z. B. annehmen, dass Arten, die sich durch besonders höhe Temperaturgrenzen auszeichnen, auch in der Natur an solchen Stellen ihre natürlichen Brutstätten haben, wo ihnen eben hohe Temperaturverhältnisse geboten werden. Ein schönes Beispiel hierfür bieten Miehes Untersuchungen (1907) über die Organismenwelt in angehäuften pflanzlichen Massen und die hier entdeckten Brutstätten von *Mucor pusillus, Actinomyces thermophilus, Aspergillus fumigatus, Bacillus calfactor* u. s. w.

Zu einer derartigen biologischen Gesellschafts-Karakterisierung sind nun für die erdbewohnenden Mucorineen meine Untersuchungen bereits genügend umfassend. Sie haben gezeigt, dass die erdbewohnenden Mucorineen in der Tat durch ziemlich niedrige Temperaturgrenzen ausgezeichnet sind, indem die obere Temperaturgrenze, mit einer einzigen Ausnahme *(M. nodosus),* nicht wesentlich über 35^{0} C. hinaufsteigt und sämtliche Arten, mit derselben Ausnahme, unter 10^{0} C. noch zur Entwickelung kommen, ja zahlreiche sogar bei Temperaturen von 6 bis 8,5^{0} C. sehr gut wachsen und reichlich fruktifizieren und daher wohl eine sehr niedrige, wahrscheinlich bei 3—4^{0} C. liegende Temperaturgrenze besitzen.

Es werden hier nur kurz meine Kulturversuche bei niedrigen Temperaturen besprochen. Hierbei ist immer auf Pepton-Glukose-Agar in Petrischalen gezüchtet worden. Ich führe hier einen der Versuche an.

Versuch Nr. 45.

Petrischalen mit Nähragar: 1 % Pepton + 1 % Glukose + gewöhnl. Salzlösung.

Temperatur 5—8,5° C. Ohne Lichtzutritt.

Nach dem Verlaufe von 10 Tagen zeigte der Versuch folgendes:

Sehr gute Entwickelung mit mehrere Centimeter breiten Kolonien (Strichkulturen) und reichlicher Fruktifikation zeigten folgende Arten:

Mucor flavus	*Mucor racemosus*	
— *strictus*	— *Christianiensis*	(I)
— *saturninus*	— *hiemalis*	
— *sphaerosporus*	— *silvaticus*	

Gutes Wachstum jedoch ohne Fruktifikation fand sich bei:

Mucor Mucedo	*Mucor circinelloides*	(II)
— *spinosus*		

Ein nur mässiges Wachstum (Kolonien 0,5—1 Cm. breit) und keine Fruktifikation zeigte:

Mucor genevensis (III)

Eine ziemlich grosse Anzahl Arten hatte gekeimt, und bildeten unter spärlichem Wachstum nur 1—5 mm. breite Kolonien. Es waren:

Mucor Ramannianus	*Mucor stolonifer*	
— *dispersus*	*Zyg. Moelleri*	
Absidia Orchidis		(IV)
— *glauca*		
— *cylindrospora*		

Keine makroskopisch sichtbare Entwickelung zeigten endlich:

Mucor nodosus und *Absidia spinosa* (V)

Im Laufe der weiteren Entwickelung verschob sich das Verhältnis nur wenig. Einige wenig gewachsene Arten aus der Klasse IV entwickelten sich etwas weiter und erlangten in die Klasse III, so vor allem *Abs. Orchidis* und *glauca*. Im Ganzen aber haben die Kulturen nach 20 Tagen ungefähr dasselbe Aussehen wie nach 10 Tagen.

Bei diesem Versuche sind nun besonders die Arten in Klasse I mit ihrem für eine so niedrige Temperatur besonders schönen Wachstum her-

vorzuheben. Die einzelnen Arten zeigen ihre karakteristischen Farben besonders schön und rein, und die ganze Gesellschaft bietet ein sehr buntes Bild von der sonst unterirdisch lebenden Mucorineenvegetation. In dicken, 2—5 Cm. hohen Rasen stehen die steifen, silberglänzenden Sporangienträger von *M. strictus* mit ihren grossen, tiefschwarzen Sporangien, daneben die fast ebenso hohen, prächtig gelben Sporangienträger von *M. flavus* mit stecknadelkopfgrossen Sporangien von einem eigentümlichen blaugelben Farbentone. *Mucor saturninus* bildet dichte, blauschwarze, sehr niedrige Sporangienrasen, von denen sich einzelne zertreute, graublaue, mehrere Centimeter hohe Sporangienträger emporheben, und *M. sphaerosporus* trägt auf mehr zerstreuten Rasen von 2 Cm. hohen Trägern seine fast schokoladenbraunen Sporangien. Der gewöhnliche *M. hiemalis* zeigt seine karakteristischen, in dichten, schwach seideglänzenden Rasen stehenden Sporangienträger mit kaum wahrnehmbaren olivengrünen oder braunen Sporangien, während *M. silvaticus* dichte Massen von weissen oder blaugrauen, steif emporgerichteten Sporangienträgern und kleinen kugeligen braunen Sporangien bildet. Daran schliessen sich endlich *M. Christianiensis* und *M. racemosus*, der erstere mit seinen sehr zerstreuten, äusserst zarten und daher bald umhersinkenden Sporangienträgern, der zweite mit niedrigen, sehr dichten, schmutzig gelbbraunen Rasen, — im Ganzen ein buntes Bild von acht sehr schönen und karakteristischen Mucorineen.

An die Arten dieser ersten Abteilung reihen sich dann die drei in Abteilung II aufgeführten, die erst bei 9—10° C. gut und reichlich fruktifizieren. *M. spinosus* bildet aber dann dichte, nur 3—5 mm. hohe, fast tiefschwarze Sporangienrasen, die ausserordentlich karakteristisch sind. *M. Mucedo* zeigt seine mehr zerstreuten, steif aufrechten Sporangienträger mit grossen, erst hellgelben, dann braunen Sporangien. *M. griseo-cyanus* endlich fruktifiziert etwas weniger reichlich, er aber bildet auch seine karakteristischen graublauen Sporangienträger mit kleinen blauschwarzen Sporangien.

Bei *M. genevensis* in der Abteilung III ist das Wachstum noch ziemlich bedeutend mit nach 10 Tagen ca. 1 Cm. breiten Kolonien, jedoch ohne Fruktifikation.

In der vierten Abteilung sind dann nicht weniger als sieben Arten aufgeführt, die bei 5—8,5° C. wohl auskeimen und etwas weiter wachsen, derer Entwickelung aber eine relativ unbedeutende ist.

Endlich stehen in der Abteilung V die beiden Arten *M. nodosus* und *Abs. spinosa*. Der erstere keimt nicht aus, von seinen Sporen sind nur einzelne aufgeschwollen, andere sind ohne jede Veränderung. Die niedere

Temperaturgrenze für Wachstum und Keimung liegt hier, wie ein besonderer Versuch gezeigt hat, zwischen 9—10° C. Bei *Abs. spinosa* haben die Sporen eben zu keimen begonnen und kurze Keimschläuche getrieben; jedes Weiterwachsen ist aber unterblieben.

Um die obere Temperaturgrenze für vegetatives Wachstum zu bestimmen, sind mehrere Versuche angestellt. Hierbei sind vorwiegend flüssige Nährmedien verwendet und speziell für alle die Versuche, an denen sich die folgenden Angaben basieren, ausschliesslich Pepton-Glukose Lösungen in schräg gestellten Reagensgläsern. Nur die zur Untersuchung der Fruktifikation dienenden Versuche sind mit Nähr-Agar von derselben Zusammensetzung in Petrischalen ausgeführt.

Es hat sich hierbei gezeigt, dass mit einer einzigen Ausnahme, nämlich *M. nodosus*, sämtliche erdbewohnende Mucorineen eine relativ niedrige obere Temperaturgrenze besitzen, und zwar liegt dieselbe bei den meisten Arten zwischen 25° und 35° C.

Nur *M. nodosus* wächst selbst bei 40° C. noch ziemlich gut, und erst bei einer Temperatur von 43—44° C. wollen die Sporen nicht mehr auskeimen. Die obere Grenze für Fruktifikation ist bei dieser Art ungefähr 38° C.

Eine relativ hohe obere Temperaturgrenze besitzen dann auch einige seltene Arten, die mir meist nur durch einzelne Isolierungen aus der Luft bekannt sind. Von diesen ist *M. arrhizus* (FISCHER) HAGEM der einzige, der früher bekannt und beschrieben ist. Meine Isolierungen dieser Art haben ihre Temperaturgrenze für Wachstum bei 42° C. und für Fruktifikation bei 36° C.

Ausserdem besitze ich aber drei noch nicht beschriebene Arten, von denen zwei, vorläufig als *Mucor* 174, a und *Mucor* 179, a bezeichnet, über 39° C., der dritte, *Mucor* 153, über 37° C. nicht auskeimen.

An diese reiht sich dann *M. circinelloides*, mit einer Temperaturgrenze von 36° C., den ich auch nur aus der Luft isoliert habe, während der seltene *Thamnidium elegans* dagegen schon bei 27° C. nicht oder nur äusserst schlecht auskeimt.

Unter den übrigen, aus dem Erdboden isolierten Arten hat nur *M. griseo-cyanus* seine Temperaturgrenze über 35° C. und zwar ungefähr bei 36,5°. Für alle die anderen Arten dagegen liegt die betreffende Grenze zwischen 35 und 25° C.

Erstens haben wir zwei Arten die eine Temperaturgrenze von 35° C. besitzen, nämlich *M. Ramannianus* und *M. dispersus*. Besonders *M. Ramannianus* keimt bei Temperaturen zwischen 30 und 33° C. auf Agarplatten gut aus und ist einer der wenigen Mucorineen, die in den Erdbodenanalysen bei dieser Temperatur zum Vorschein kommen.

Eine fast ebenso hohe Temperaturgrenze zeigt *M. spinosus*, der erst bei 34° C. nicht auskeimt.

Darauf folgt aber eine ganze Reihe von typisch erdbewohnenden Mucorinen, die ungefähr bei 33° C. ihre obere Temperaturgrenze haben. Es sind die folgenden Arten: *M. strictus*, *M. hiemalis*, *Abs. Orchidis*, *Abs. glauca*, *Abs. cylindrospora* und *Zyg. Moelleri*.

Eine nur etwas niedrigere obere Grenze haben die letzten noch über 30° C. auskeimenden Arten, nämlich *M. racemosus* und *M. Christianiensis* und zwar beide bei 32° C.

Die übrigen untersuchten Arten besitzen sämtliche eine relativ niedrige obere Grenze, indem keine von ihnen bei 30° C. auskeimen. Durch einige Versuche wurde für drei Arten, *M. saturninus*, *M. genevensis* und *M. silvaticus* 29° C. als Grenztemperatur festgestellt, für *M. sphaerosporus* und *M. flavus* 27° C., während für *M. piriformis*, der wahrscheinlich auch im Erdboden vorkommt, die besonders niedrige Temperaturgrenze von 25° C. gefunden wurde.

Wie aus dieser zusammenfassenden Darstellung hervorgeht, besitzen die erdbewohnenden Mucorineen eine relativ niedrige obere Temperaturgrenze. *M. nodosus* ausgenommen (43° C.) liegt sie nämlich bei den anderen Arten zwischen 25 und 35° C. und zwar in den meisten Fällen bei 33° C. oder noch niedrigerer Temperatur.

Die Bestimmung der optimalen Temperatur für vegetatives Wachstum bietet natürlich grössere Hindernisse. Erstens ist nämlich die Lage des Temperaturoptimums in weit höherem Grade als bei der oberen und unteren Grenze, von der Zusammensetzung des Nährsubstrates abhängig. Ausserdem lässt sich die optimale Temperatur mit einiger Schärfe nur durch sehr genau vergleichbare Versuche bestimmen, wobei das in einer bestimmten Zeit (z. B. 10 Tagen) gebildete Myzel sorgfältig getrocknet und gewogen wird, und das grössere oder kleinere Trockengewicht dann als Maasstab für das Gedeihen und Wachstum des Pilzes verwendet wird. Derartige zeitraubende Versuche habe ich nicht angestellt, um so mehr als eine genaue Optimumsbestimmung ein bei weitem nicht so grosses Interesse beansprucht wie die oberen und unteren Temperaturgrenzen.

Ich kann daher nur als eine durch meine zahlreichen Kulturversuche gewonnene Erfahrung anführen, dass das Temperaturoptimum für vegetatives Wachstum, wenn rasche Entwickelung und Wachstum erwünscht ist, für die meisten erdbewohnenden Arten zwischen 20 und 25° C. liegt.

Zuletzt mag hier in tabellarischer Form die für die obere Temperaturgrenze gefundenen Zahlen aufgeführt werden:

M. strictus	33⁰ C.	*M. silvaticus*	29⁰ C.
M. saturninus	29 »	*M. spinosus*	34 »
M. Ramannianus	35 »	*M. circinelloides*	36 »
M. piriformis	25 »	*M. stolonifer*	32,5 »
M. flavus	27 »	*M. nodosus*	43 »
M. sphaerosporus	27 »	*M. arrhizus*	42 »
M. racemosus	32 »	*Abs. Orchidis*	33 »
M. Christianiensis	32 »	*Abs. glauca*	33 »
M. dispersus	35 »	*Abs. cylindrospora*	33 »
M. hiemalis	33 »	*Zyg. Moelleri*	33 »
M. griseo-cyanus	36,5 »	*Thamn. elegans*	27 »
M. genevensis	29 »		

Kap. VII. Lebensbedingungen der Mucorineen im Erdboden.

Durch zahlreiche Annalysen habe ich den Gehalt des Erdbodens, vornehmlich des unbebauten Bodens, auf Mucorineenkeime hin untersucht. Hierbei ist eine Reihe von Arten isoliert worden, die ich teils schon in meiner vorigen Arbeit (1908) teils in einer kleinen Abhandlung (1910) beschrieben habe. Diese Mucorineen sind zu jeder Zeit aus dem Erdboden zu isolieren, sie haben hier eben zu Hause und die oberen Schichten des Bodens sind als ihre eigentliche Brutstellen zu betrachten. Der Gehalt der verschiedenen Böden an Mucorineen ist im ersten Abschnitt dieser Abhandlung besprochen und braucht daher hier nicht noch einmal angegeben werden.

In den folgenden Kapiteln wurden dann die verschiedenen biochemischen Versuche und die Temperaturverhältnisse der zahlreichen Arten untersucht.

Es bleibt uns nur noch zu diskuttieren in welchem Verhältnis diese Pilze zu den sich im Erdboden abspielenden Abbauprozessen stehen und welcher Anteil ihnen bei diesen zugeschrieben werden kann.

Zuerst mag nun aber kurz auf die Abhängigkeit der Pilze von der Temperatur und Feuchtigkeit eingegangen werden.

Mit Rücksicht auf die Abhängigkeit von der Temperatur bei ihrem Wachstum sind die Erdboden-Mucorineen für das Leben in den oberen Schichten des Bodens sehr gut angepasst. Die meisten von ihnen können, wie in dem vorigen Abschnitte bewiesen wurde, in künstlichen Kulturen selbst bei einer sehr niedriegen Temperatur, wie 6—8° C., gut gedeihen, und bei 12—15° C. sind sämtliche Arten gut zur Entwickelung zu bringen. Die schöne Entwickelung mit sehr gutem Wachstum schon bei Temperaturen unter 10° C. ist an und für sich bemerkenswert und scheint auch dafür zu sprechen, dass diese Pilze eben im Erdboden ihre Brutstellen haben. Auch die optimale Temperatur für Wachstum liegt besonders niedrig, wahrscheinlich für die meisten Arten zwischen 18 und 24° C. Die obere Temperaturgrenze ist besonders niedrig. Sie liegt gewöhnlich zwischen 27 und 33° C. und nur zwei von den aus dem Erdboden isolierten Arten haben ihre obere Temperaturgrenze höher als 35° C.

Im Ganzen bilden also die Erdboden-Mucorineen mit Rücksicht auf ihre Temperaturansprüche eine ziemlich einheitliche Gesellschaft, die dem Leben im Erdboden gut angepasst ist.

Die Feuchtigkeit der oberen Erdbodenschichten ist natürlich eine sehr wechslende und hat im Ganzen dadurch einen sehr grossen Einfluss auf das Wachstum der Pilze. Eine mässige Feuchtigkeit wird das Wachstum befördern, eine viel zu grosse dagegen wegen erschwerten Luftzutrittes herabsetzen und Austrocknen endlich das Wachstum völlig verhindern. In dem letzten Falle können sich die Pilze nur durch ihre Sporen, die gegen Austrocknen sehr widerstandsfähig sind, erfolgreich gegen Absterben schützen.

Gewöhnlich leben wohl die Erdboden-Mucorineen mehr oder weniger vollständig unterirdisch, allenfalls darf im Frühling und Sommer die trockene Luft eine oberirdische Schimmelvegetation verhindern. In feuchten Herbsten aber werden häufig mehrere der gewöhnlichsten Arten auch an der Oberfläche des Bodens beobachtet. Besonders in dem regnerischen und feuchten Herbst im Jahre 1907 konnte man in den Nadelwäldern der Umgebung Kristianias an mehreren Stellen eine vollständige Verschimmelung des Waldbodens beobachten. *Fusarium-* und *Mortierella-*Arten waren besonders häufig zu sehen, die ersteren an abgestorbenen Pflanzenteilen, die letzteren an verfaulenden Pilzen. Hier sah ich auch eine so grosse *Penicillium-*Verschimmelung, wie ich sie weder früher noch später gesehen habe. Besonders zahlreiche Agaricineen, aber auch einige *Boletus-*Arten waren von grossen hell- bis dunkelgrünen, ausserordentlich reichlich fruktifizierenden *Penicillium-*Rasen völlig bedeckt. Daneben wurden aber auch *Mucor-*Arten beobachtet. An feuchten, schattigen Stellen fand ich mehrmals lockere Rasen von zarten Sporangienträgern, die sich bei näherer Untersuchung als *M. hiemalis* angehörig erwiesen.

Die Kolonien von diesem Pilze waren besonders an abgestorbenen Stengeln verschiedener Waldkräuter zu sehen. Andere Arten dagegen, wie *M. flavus* und *M. silvaticus*, traten an verfaulenden Pilzen auf. Besonders erinnere ich mich hier einer verfaulenden Agaricinee, fast 20 Cm. in Diameter, die von einer reichlich fruktifizierenden Decke von *M. silvaticus* bedeckt war, aus welcher es mir eben gelang die beiden Geschlechter dieser Art mit reichlichen Zygosporen rein zu züchten. Auch *Mortierella-*Arten und *Sporodinia Grandis* wurden diesen Herbst an verfaulenden Pilzen in grossen Mengen angetroffen.

Die regnerischen, feuchten Jahreszeiten, wie besonders der Herbst, begünstigen also das oberirdische Wachstum, sonst aber leben und fruktifizieren diese Pilze meist unterirdisch zwischen verwesenden Pflanzenresten

und lebenden Wurzeln. Nur gelegentlich kommen sie an der Oberfläche des Bodens zum Vorschein.

Es fragt sich nun demnächst, welchen Anteil wir den Erdboden-Mucorineen an den Zersetzungsprozessen des Erboden-Materials zuschreiben können.

Zwar gehören die Erdboden-Mucorineen nicht zu den Pilzen, die im Erdboden mit der grössten Keimzahl vorkommen. Vielmehr werden sie in dieser Hinsicht besonders von *Penicillium*-Arten übertroffen, unter denen zwei grüne Formen (wohl aus dem *Pen. crustaceum*-Komplex) und besonders eine Art, die wohl der Gattung *Citromyces* anhört, durchaus dominieren und mit einer Keimzahl vorkommen, die das 5—10 fache des gesammten Mucorineengehaltes beträgt. Auch andere Pilze sind den Mucorineen in Keimgehalt überlegen, so vor allem *Cladosporium herbarum* und mehrere *Aspergillus*-Arten. Der erstere ist nicht immer zugegen, wenn er aber in einer Erdprobe erst vorkommt, ist er gewöhnlich der weitaus meist dominierende. Auch *Saccharomyces* und *Torula*-Arten sind häufig vorkommend und zudem auch die zahlreichen Rosahefe-Formen.

Obschon also die Mucorineen in Keimzahl meist nicht dominieren, drängen sie sich jedoch bei jeder Erdboden-Analyse dem Beobachter durch ihr schnelles Wachstum und schöne Entwickelung auf. Sie machen in zahlreichen Arten vorkommend einen so karakteristischen Teil der Erdbodenflora aus, dass sie ohne Zweifel eine Rolle bei der Zersetzung der organischen Verbindungen im Erdboden spielen dürfen.

In dem zweiten Abschnitte dieser Abhandlung sind die physiologischen Eigenschaften der meisten Erdboden-Arten untersucht worden, und wir werden nun versuchen, von den Ergebnissen dieser Untersuchungen ausgehend, uns eine Vorstellung über die Lebensbedingungen dieser Pilze zu bilden, besonders mit Rücksicht auf ihre Aufnahme von Nährstoffen und die dabei bewirkten Zersetzungen.

Was nun zuerst den Gehalt des Boden an Kohlenstoffverbindungen angeht, so ist dieser natürlich im kultivierten, gut durchbearbeiteten Erdboden viel geringer als im sauren, humösen Waldboden, wo mehr oder weniger stark verwesende Pflanzenteile den Hauptteil der oberen Schichten ausmachen. Dieses Pflanzenmaterial besteht nun hauptsächlich aus sehr komplizierten Kohlenstoffverbindungen wie Zellulose, Hemizellulose, Pektinen u. s. w. und nur zu einem kleineren Teil dürfen sie die weniger komplizierten Di- und Monosaccharide enthalten. Von diesen Verbindungen können sich die Mucorineen nur die Pektinkörper und Monosaccharide, z. T. auch Disaccharide nützlich machen, während sie die Hauptmasse des Kohlenstoffes, die Zellulose und die Hemizellulosen, intakt lassen. Auch

die aus den Pflanzenresten gebildeten Huminsubstanzen, wie Huminsäure, sind, wie NIKITINSKY's Untersuchungen (1902) zeigen, ihnen als C-Quellen vollständig nutzlos.

Die Erdboden-Mucorineen können daher bei der Zersetzung der Kohlenstoffverbindungen im Erdboden nur eine, den übrigen Pilzen und den Bakterien gegenüber, sehr beschränkte Rolle spielen und wenn sie trotzdem ihren Kohlenstoffbedarf decken können, so geschieht dies hauptsächlich auf Kosten der Pektinkörper und der Di- und Monosaccharide. Ohne Zweifel werden nun bei der starken Zersetzung der Zellulose und der Hemizellulose durch andere Pilze und Bakterien grössere Mengen einfach gebauter Kohlenstoffverbindungen gebildet, die sich auch die *Mucor*-Arten z. T. aneignen können.

Ganz anders darf es sich hinsichtlich des Stickstoffbedarfs dieser Pilze und der von ihnen bewirkten Umsetzungen von Stickstoffverbindungen verhalten. Im Ganzen sind die Mucorineen hier als sehr aktiv anzusehen, nicht nur ihrer energischen Spaltungsfähigkeit wegen sondern auch wegen ihres schnellen Wachstums, in welcher Hinsicht sie die meisten ihrer Konkurrenten unter den Schimmelpilzen übertreffen.

Was nun die anorganischen Stickstoffverbindungen, wie Nitrite, Nitrate und Ammoniumsalze betrifft, so dürfen wir wohl für diese eine energische Verarbeitung voraussetzen. Der Gehalt des unbebauten Bodens, vornehmlich des sauren Waldbodens, an Nitraten, wird gewöhnlich fast als Null angesehen. Dass dieses jedoch nicht immer zutrifft, haben besonders die neuen, sehr interessanten Untersuchungen von WEIS (1908) gezeigt. Es wird hier durch zahlreiche Analysen der Nachweis geführt, dass in typischem Mullboden (Waldboden) fast zu jeder Jahreszeit kleinere oder grössere Salpetersäuremengen vorkommen. Auch für den sauren Waldboden dürfen wir einen Salpetersäure-Gehalt nicht ohne weiteres ablehnen; denn selbst wenn die gewöhnlichen nitrifizierenden Bakterien hier nicht vorkommen, so zeigen jedoch Erdbodenanalysen auch hier eine nicht unbedeutende Flora von Bakterien, die, trotz der sauren Reaktion, hier gut gedeihen und unter denen sich auch wohl andere nitrifizierende Arten finden können als die, die in gebautem Erdboden gewöhnlich vorkommen.

Die im Waldboden eventuell vorkommenden Nitrate können nun aber von den meisten hier lebenden Mucorineen nicht verarbeitet werden. Die typischen Waldboden-Mucorineen sind fast sämtliche Arten, denen keine nitratreduzierende Fähigkeit zukommt, und die sonst nitratverarbeitenden Arten wie *M. spinosus* und *M. racemosus* kommen hier nur mehr gelegentlich vor.

Ganz anders dagegen verhält es sich im kultivierten Erdboden, wo eben mit grossen Mengen Nitraten gedüngt wird und wo auch nitratreduzierende Arten wie *M. Christianiensis*, *M. spinosus*, *M. racemosus* häufig vorkommen. Hier können wir, wenn erst für den Kohlenstoffbedarf genügende organische Verbindungen zugegen sind, durch die Mucorineen (und andere nitratreduzierende Pilze) eine ziemlich energische Salpetersäureverarbeitung und also eine schädliche Überführung des Nitratstickstoffes in schwer zersetzbares Pilzeiweiss annehmen.

Der Ammoniakstickstoff, der dem kultivierten Boden als anorganische Salze zugeführt wird, unterliegt natürlich durch die Mucorineen wie die Bodenpilze überhaupt einer energischen Verarbeitung. Die schädlichen Einflüsse, die in künstlichen Kulturen durch die freiwerdenden Säureanionen bewirkt werden, spielen natürlich im Erdboden keine Rolle, da ja hier immer genügende Mengen von neutralisierenden Basen vorliegen.

Die organischen Stickstoffverbindungen wie Peptone, Aminosäuren, Harnstoff, Harnsäure u. a. werden von den Mucorineen wie wohl von den Schimmelpilzen überhaupt sehr schnell verarbeitet. Diese Verarbeitung geschieht durch Ammoniakabspaltung, und nachdem was wir in dem zweiten Abschnitte für künstliche Kulturen gesehen haben, können wir annehmen, dass ein Teil des hierbei gebildeten Ammoniaks assimiliert und als Pilzeiweiss festgelegt wird, ein anderer und grösserer Teil dagegen findet für das Wachstum keine Anwendung und wird daher in den Erdboden frei heraustreten können.

Mit Rücksicht auf die Stickstoffassimilation können wir nun gewiss unsere für die Mucorineen gewonnenen Resultate auf die meisten Erdbodenpilze ausdehnen. Schon seit Nägeli's Tagen (vergleiche die Arbeiten dieses Forschers von 1879—82) kommen in der Literatur hie und da Angaben über Stickstoffassimilation durch Ammoniakabspaltung vor, und besonders Marchal (1893) hat für mehre Pilze dieses Moment eingehend behandelt und auch die Ammoniakbildung im Erdboden hauptsächlich den Pilzen zugeschrieben. Diese Resultate Marchal's haben meine Untersuchungen für die Mucorineen durchaus bestätigt.

Die Bedeutung der Erdboden-Schimmelpilze für die Stickstoffumsetzungen, oder den Kreislauf des Stickstoffes im Erdboden, muss also, je nachdem für die Assimilation bereits fertige Ammoniumsalze oder die noch einer Zersetzung bedürfenden organischen Stickstoffverbindungen vorliegen, etwas verschieden sein.

Im ersteren Falle, wenn fertige Ammoniumsalze vorliegen, wird das Ammonium sehr schnell verarbeitet und als Pilzeiweiss festgelegt. Dadurch werden also grössere oder kleinere Mengen von einer leicht assimilierbaren

Stickstoffverbindung den übrigen Pflanzen, besonders den höheren entraubt und in einer Form überführt, in welcher es von diesen nicht verarbeitet werden kann. In diesem Falle ist also die Tätigkeit der Erdbodenpilze eine für die grüne Vegetation des Bodens durchaus schädliche.

Im zweiten Falle aber, wenn es sich um die aus toten Pflanzen und Tier-Resten stammenden, komplizierten, organischen Verbindungen handelt, spielen die Erdboden-Pilze eine sehr nützliche Rolle. Aus diesen Verbindungen spalten sie nämlich z. B. den fest gebundenen Amin-Stickstoff als Ammoniakstickstoff ab; zwar wird von diesem ein kleinerer Teil wieder verarbeitet und in Pilzeiweiss festgelegt, aber wahrscheinlich der weitaus grösste Teil wird frei und kann entweder als Ammoniak oder nach Umwandlung in Salpetersäure durch nitrifizierende Mikroben von den grünen Pflanzen wieder aufgenommen werden.

Im Ausführen dieses Prozesses, also in der Mineralisierung des organisch gebundenen Stickstoffs, muss den Erdboden-Pilzen eine Hauptrolle zugeschrieben werden. Ohne Zweifel sind sie hier, wie schon mehrmals hervorgehoben ist, den Bakterien weitaus überlegen. (Siehe hier besonders die Zusammenfassung in EHRENBERG: Die Bewegung des Ammoniakstickstoffs in der Natur. Berlin 1907).

Kap. VIII. Resumée.

Ad. Kap. I. Verbreitung der Mucorineen im Erdboden.

1. Eine Reihe von Mucorineen sind aus dem Erdboden isoliert worden. Durch eigne und Untersuchungen anderer Forscher sind bisjetzt ungefähr 30 Arten aus dem Erdboden bekannt. Sie bilden einen karakteristischen Bestandteil der unterirdischen Pilzflora und die meisten Arten haben im Erdboden eben ihre natürlichen Brutstellen.
2. Die Zusammensetzung der Mucorineenflora wechselt mit dem Karakter und den Eigenschaften des Bodens. Die Mucorineengesellschaft des kultivierten Ackerbodens ist z. B. von der des Nadelwaldbodens deutlich verschieden und besteht z. T. von ganz anderen Arten als es in diesem angetroffen wird.
3. Die Beziehung der Erdboden-Mucorineen zu der Mykorrhiza der höheren Pflanzen ist noch nicht aufgeklärt. Die Mucorineenflora, die sich aus Mykorrhizawurzeln entwickelt, besteht meist aus den sonst im betreffenden Boden gewöhnlich vorkommenden Arten so z. B. für Nadelbäume *M. hiemalis* und *M. Ramannianus*. Ob diese Arten mit der Mykorrhiza etwas zu tun haben, kann erst durch künstliche Kultivierung und Hervorrufen der karakteristischen Mykorrhizabildungen nach Infektion mit reingezüchteten Pilzen entschieden werden.
4. Die pilzbewohnenden Mucorineen sind teils als fakultativ teils als mehr obligat pilzbewohnende Arten anzusehen. Als fakultative Pilzbewohner können wahrscheinlich die meisten Erdboden-Arten auftreten, häufig aber sind nur *M. flavus*, *M. silvaticus* und ausserdem mehrere *Mortierella*-Arten. Diese haben im Erdboden ihre eigentlichen Brutstellen und kommen an verfaulenden Pilzen nur gelegentlich vor.

   Unter den wahrscheinlich mehr oder weniger obligat pilzbewohnenden Mucorineen sind die Gattungen *Spinellus*, *Dicranophora* und *Sporodinia* aufzuführen. Diese sind noch nicht im Erdboden gefunden, meist oder ausschliesslich dagegen an verfaulenden Agaricineen. Ob sie absolut an diesem Substrate gebunden sind, ist wohl zweifelhaft, vorläufig sind sie allenfalls nur hier gefunden. Ihr Verhältnis bedarf weiterer Untersuchungen.

Ad. Kap. III. Die Stickstoffresorbtion der erdbewohnenden Mucorineen.

5. Die Nitrite und Nitrate werden nur von einer beschränkten Anzahl Arten verarbeitet. Die Fähigkeit Nitrite und die Fähigkeit Nitrate zu verarbeiten kommt denselben Arten zu und wird also wahrscheinlich von einer und derselben, besonderen Eigenschaft des Protoplasmas bedingt. Bei der Nitratverarbeitung lässt sich meist immer Salpetrige Säure und Ammoniak nachweisen, bei der Nitritverarbeitung auf dieselbe Weise Ammoniak.

   Die Verarbeitung dieser hochoxydierten Stickstoffverbindungen geschieht daher durch eine Reduktion, wobei das Endprodukt Ammoniak ist. Der Stickstoff findet also hier erst als Ammoniak für die Eiweisssyntese Verwendung.

6. Von Ammoniumsalzen sind sowohl anorganische wie organische Salze untersucht worden.

   Der Nährwert der anorganischen Salze wird durch zwei Verhältnisse bedingt. Erstens kommt es durch Verarbeitung von dem Kation NH_4 sehr schnell zu einer schädlichen Säureanhäufung, die das Wachstum bald vollständig verhindert. Durch Neutralisation mit $CaCO_3$ kann aber auch mit anorg. Ammoniumsalzen gute Entwickelung erzielt werden. Das Ammoniumnitrat nimmt hier bei den Arten, die eine Nitratreduktion ausführen können, eine besondere Stellung ein, indem hier sowohl die Kationen NH_4 als auch die Anionen NO_3 mit ungefähr derselben Schnelligkeit verarbeitet werden. Es kommt hier nicht zu Säureanhäufung und das Ammoniumnitrat ist daher für diese Pilze eine gute N-Quelle.

   Zweitens hängt der Nährwert der anorg. Ammoniumsalze, wie schon Butkewitsch gezeigt hat, von der Affinität ihres Säure-Ions zum Ammonium-Ion ab. Je grösser diese Affinität ist, je kleinere Mengen NH_4 vermögen die Pilze zu verarbeiten.

   Von den organischen Ammoniumsalzen ist nur das äpfelsaure Salz geprüft worden. Es hat sich als eine sehr gute Stickstoffquelle gezeigt.

   Im ganzen sind 20 Mucorineen geprüft worden. Sämtliche diese kommen mit Ammoniumsalzen als einzige N-Quelle sehr gut heraus.

7. Harnstoff wird bei Glukosezusatz von sämtlichen geprüften Arten als N-Quelle verarbeitet. Hierbei wird Ammoniumkarbonat (bezw. Ammoniak) gebildet. Die Umwandlung des Harnstoffes erfolgt bei den verschieden Pilzen mit recht verschiedener Schnelligkeit. Z. B. war bei *M. Christianiensis* nach 10-tägiger Kulturdauer ungefähr

31,8 % des gebotenen Harnstoffes in der Nährlösung als Ammoniak zugegen, bei *M. nodosus* dagegen nur 1,2 %.

8. Azetamid kommt als N-Quelle für die Mucorineen kein oder nur geringer Nährwert zu. Die Mucorineen verhalten sich daher recht abweichend, indem für mehrere andere Pilze, z. B. *Aspergillus niger* nach CZAPEKS und eignen Versuchen, das entgegengesetzte konstatiert ist. Dieser Pilz verarbeitet Azetamid rasch unter gutem Wachstum und deutlicher Ammoniakabspaltung. Worauf dieses eigentümliche Verhalten der Mucorineen beruht ist noch nicht untersucht worden, wahrscheinlich wird es aber dadurch bedingt, dass sie das zur Azetamidverarbeitung nötige, ammoniakabspaltende Enzym nicht produzieren können.

9. Die Harnsäure findet, obgleich fast unlöslich, jedoch als N-Quelle gute Verwendung. Wahrscheinlich findet bei ihrer Verarbeitung Ammoniakabspaltung statt. Eine solche konnte jedoch in den Kulturen nicht mit Sicherheit konstatiert werden, da die gebildeten Ammoniakmengen augenscheinlich schnell verbraucht werden.

10. Die geprüften Aminosäuren sind teils ohne Glukosezusatz verwendet, also als gleichzeitige C- und N-Quelle, teils bei Glukose als ausschliessliche N-Quelle.

Als gleichzeitige C- und N-Quelle kommt den Aminosäuren im Allgemeinen nur ein kleiner oder mittlerer Nährwert zu. Bei ihrer Verarbeitung findet dann immer eine Ammoniakabspaltung statt, die dem grösseren oder kleineren Wachstum meist proportional ist. Der Kohlenstoffkomponent muss also hierbei als Atmungsquelle dienen.

Bei Glukosezusatz zeigen sich die Aminosäuren als vorzügliche N-Quellen, besonders Leuzin aber auch Tyrosin. Es findet auch hierbei eine bedeutende Ammoniakabspaltung statt.

Es muss daher ganz allgemein angenommen werden, dass die pilzliche Aminosäureverarbeitung auf die Weise vorgeht, dass durch H_2O-Anlagerung Ammoniak und die entsprechende Oxysäure gebildet werden. Der Stickstoff findet also erst als Ammoniak für die Eiweisssyntese Verwendung.

Übrigens scheint Leuzin von den übrigen Aminosäuren wie Glykokoll und Asparagin etwas verschieden verarbeitet zu werden, indem sich die Leuzin-Kulturen durch ihre kleinere Alkalität und schwächere Ammoniakreaktion von den anderen etwas unterscheiden.

Betreffs Einzelkeiten bei jeder Aminosäure kann hier nur auf das betreffende Kapitel hingewiesen werden.

11. Pepton gestattet den Pilzen, sowohl wenn Zucker zugegeben ist, als auch wenn es als gleichzeitige C- und N-Quelle dient, eine gute Entwickelung. Bei der Peptonverarbeitung ist immer Ammoniakbildung nachweisbar.

    Die Produktion von proteolytischen, gelatinelösenden Enzymen ist in Peptonkulturen bei den verschiedenen Arten eine recht verschieden grosse; bei *M. nodosus* ist sie besonders stark, bei *M. strictus* fast keine.

12. Hippursäure wird von einer verhältnismässig geringen Anzahl Arten verarbeitet. Sowohl bei Verarbeitung der freien Säure wie ihres Natriumsalzes wird wahrscheinlich die Säure zuerst in Benzoesäure und Glykokoll gespalten. Darauf unterliegt das Glykokoll unter Ammoniakabspaltung einer weiteren Verarbeitung, indem in fast sämtlichen gut gewachsenen Kulturen grosse Ammoniakmengen nachweisbar sind. Je nachdem die Hippursäure als freie Säure oder Na-Salz den Pilzen geboten wird, scheint das Schicksal der gebildeten Benzoesäure etwas verschieden zu sein. Im ersten Falle wird sie allenfalls bei mehreren Arten teilweise zu Benzaldehyd reduziert, im zweiten Falle dagegen ist kein Benzaldehydgeruch wahrnehmbar und die Säure scheint hier keine Reduktion zu unterliegen.

13. Bei der Verarbeitung der verschiedensten Stickstoffverbindungen wie Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren, Hippursäure u. a. findet sich eine Ammoniakbildung als durchgängige Erscheinung.

    Diese Tatsache scheint in hohem Grade die schon von Loew und Abderhalden aufgestellte Annahme zu stützen, wonach es die Pilze bei jeder Stickstoffresorption Ammoniak bilden müssen und erst von diesem aus ihre Eiweisssyntese beginnen können.

Ad. Kap. IV. Die Kohlenstoffresorption der Erdboden-Mucorineen.

14. Von den mehrwertigen Alkoholen können Glyzerin und Mannit, mit Ammoniumsulfat als N-Quelle, nicht als Kohlenstoffquelle dienen. Wenn dagegen KNO_3 als N-Quelle verwendet wird, entwickeln sich 3—4 Arten etwas und können daher diese Verbindungen verarbeiten.

15. Von den Disacchariden eignet sich, mit anorg. Ammoniumsalzen als N-Quelle, besonders die Maltose für die meisten Arten sehr gut. Die Saccharose wird nur von einer beschränkten Anzahl Arten verarbeitet und die Lactose von gar keinen.

16. Von den Polyosen sind nur Inulin und Stärke untersucht worden. Das erstere wird mit anorg. Ammoniumsalzen als N-Quelle nur von 3 Arten verarbeitet, die letztere wird unter gleichen Bedingungen eigentlich nur von wenigen Arten und zwar in sehr kleinem Masse verwertet.

17. Pektinsäure, aus Karotten und Rüben gewonnen, kann als Na-Pektinat den meisten Erdboden-Mucorineen als C-Quelle dienen. Nur *M. silvaticus* und *M. stolonifer* können mit Na-Pektinat und anorg. Ammoniumsalzen nicht gedeihen.

Wahrscheinlich hat Behrens bei seinen Versuchen mit Taurotte von Flachs und Hanf daher nicht mit *M. stolonifer* gearbeitet, sondern mit dem nahestehenden *M. nodosus*, der im Erdboden allgemein verbreitet ist und der die Pektinsäure relativ schnell zersetzt.

Eine Entstehung von reduzierenden Verbindungen (Monosaccharide) konnte bei der Pektinsäureverarbeitung nicht deutlich nachgewiesen werden, wahrscheinlich jedoch nur weil die Stoffe von den Pilzen schnell resorbiert werden.

18. Das Xylan, aus Sägemehl von Birkenholz gewonnen, wird von den Erdboden-Mucorineen nicht verarbeitet. Diese unterscheiden sich hierdurch von anderen Erdboden-Pilzen wie z. B. *Trichoderma*, die auf Xylan-Ammoniumsalz-Lösungen sehr gut gedeihen.

19. Die Zellulose, als Filtrierpapier verwendet, wird von keinem der Mucorineen zerstört. Auch hier stehen sie also in Gegensatz zu den gewöhnlichen Fungi imperfecti aus dem Erdboden, die eine schnelle Zerstörung des Filtrierpapiers bewirken.

20. Die meisten Mucorineen sind im Stande die geprüften Glukoside (Salicin und Helicin) zu spalten. In 1 prozentiger Lösung mit anorg. Ammoniumsalzen als N-Quelle kommt dem Salicin als C-Quelle ein mittlerer Nährwert zu, dem Helicin dagegen keiner.

Werden die Glukoside den Pilzen gleichzeitig mit Glukose dargeboten, so unterliegen sie, am stärksten bei Salicin, weniger bei Helicin, einer Spaltung, und das Benzolderivat ist meist als Salicylaldehyd in der Lösung nachweisbar.

21. Die untersuchten Mucorineen und besonders die Erdboden-Arten können recht zahlreiche Kohlenstoffverbindungen nicht angreifen, allenfalls wenn ihnen nur anorg. Ammoniumsalze als N-Quelle geboten werden. Eine gute Entwickelung ist eigentlich nur mit Monosacchariden, Maltose (und Pepton) zu erziehlen. Ausserdem werden Pektinsäure

und teilweise auch Saccharose und Glukoside verarbeitet, während Glyzerin, Mannit, Laktose, Inulin, Stärke, Xylan und Zellulose als C-Quellen meist geringer oder keiner Nährwert zukommt.

Ad. Kap. V. Säurebildung.

22. Unter den Erdboden-Mucorineen wird bei sämtlichen geprüften *Absidia*-Arten eine bedeutende Oxalsäure-Produktion beobachtet. Die Oxalsäure wird wahrscheinlich durch unvollständige Oxydation der Glukose gebildet, indem sie in ihrem Auftreten von den verschiedenen Stickstoffverbindungen meist unabhängig ist.

Bei den eigentlichen *Mucor*-Arten ist Oxalsäure nicht nachweisbar. Hier wird indessen eine mehr oder weniger starke Bildung einer anderen noch nicht untersuchten Säure beobachtet. (Vielleicht Zitronensäure).

Ad. Kap. VI. Abhängigkeit von der Temperatur.

23. Die untere Teperaturgrenze liegt für die Erdboden-Mucorineen besonders niedrig. Die meisten Arten kommen unter 10^0 C. gut zur Entwickelung und selbst bei einer Temperatur von ca. 7^0 C. zeigen mehrere von ihnen ein sehr gutes und schönes Wachstum.

Die obere Temperaturgrenze ist auch niedrig. Sie liegt für die meisten Arten zwischen 27 und 33^0 C., gewöhnlich nicht unweit 30^0 C.

Das Temperaturoptimum ist nicht genau bestimmt worden, liegt jedoch für gewöhnlich zwischen 20 und 25^0 C.

Ad. Kap. VII. Lebensbedingungen im Erdboden.

24. Für die Zersetzung und Resorption der verschiedenen anorganischen und organischen Verbindungen im Erdboden haben die Mucorineen eine verschieden grosse Bedeutung, je nachdem es sich um die Kohlenstoffverbindungen oder die Stickstoffverbindungen handelt.

Die meisten Kohlenstoffverbindungen, wie vornehmlich Zellulose und Hemizellulose, werden von den Mucorineen intakt gelassen und nur Verbindungen wie Monosaccharide, Disaccharide und Pektinkörper werden verarbeitet.

Die Stickstoffverbindungen dagegen werden allgemein verarbeitet.

Die Bedeutung der Erdboden-Mucorineen, wie der Erdboden-Schimmelpilze überhaupt, für den Kreislauf des Stickstoffs im Erdboden ist besonders in zwei Richtungen zu pointieren.

Der schon existierende Ammoniakstickstoff (wie Ammoniumsalze) wird rasch von den Pilzen verarbeitet, in schwer zersetzbares Pilzeiweiss übergeführt und auf diese Weise den höheren Pflanzen entzogen.

Der Amin- oder Amidstickstoff der zahlreichen, organischen Verbindungen wird sehr energisch in Ammoniakstickstoff übergeführt. Ein Teil dieses Ammoniakstickstoffs wird zwar wieder in Pilzeiweiss übergeführt, der meiste aber tritt frei in den Erdboden heraus und kann dadurch wieder von höheren Pflanzen aufgenommen werden.

Literaturverzeichnis.

ABDERHALDEN, E.

1906. Lehrbuch der physiologischen Chemie. Berlin-Wien 1906.

ABDERHALDEN, E. und RONA, P.

1905. Die Zusammensetzung des »Eiweiss« von *Aspergillus niger* bei verschiedener Stickstoffquelle. Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XLVI, 1905, S. 179. Nur Referat gesehen (ABDERHALDEN: Lehrbuch d. physiol. Chemie).

BAINIER, G.

1903. Sur quelques espèces de Mucorinées nouvelles ou peu connues. Bull. Soc. myc. de France, T. XIX, 1903, S. 153.

DE BARY, A.

1886. Über einige Sclerotien u. Sclerotienkrankheiten. Bot. Ztg. XLIV, 1886, S. 377.

BEHRENS, J.

1902. Untersuchungen über die Gewinnung der Hanffaser durch natürliche Röstmetoden. Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., Bd. VIII, 1902, S. 114.

1903. Über die Taurotte von Flachs und Hanf. Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., Bd. X, 1903, S. 524.

BEIJERINCK, M. W.

1900. Über Chinonbildung durch *Streptothrix chromogena* und Lebensweise dieses Mikroben. Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., B. VI, 1900, S. 2.

BENECKE, W.

1894. Ein Beitrag zur mineralischen Nährung der Pflanzen. Ber. d. deutsch. Bot. Gesellsch., Bd. XII, 1894, Generalvers. heft, S. [105].

1895. Die zur Ernährung der Schimmelpilze notwendigen Metalle. Pringsh. Jahrb. f. wiss. Botanik, Bd. XXVIII, 1895, S. 487.

1896. Die Bedeutung des Kaliums und des Magnesiums für Entwickelung und Wachstum des *Aspergillus niger* v. THIEGH., sowie einiger anderer Pilzformen. Bot. Ztg. LIV, 1896, S. 97.

BLAKESLEE, A. F.

1904. Sexual reproduction in the Mucorineae. Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences. Vol. XL, 4. Contributions from the Cryptogamic Laboratory of Harvard University. LVIII.

BOURQUELOT, E.

1893 a. Remarques sur les ferments solubles sécrétés par *l'Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*. Compt. rend. Soc. Biol., Paris, T. XLV, 1893, S. 653.

1893 b. Présence et rôle de l'émulsine dans quelques champignons parasites des arbres ou vivant sur les bois. Compt. rend. Soc. Biol., Paris, XLV, 1893, S. 804.

1893 c. Inulase et fermentation alcoolique indirecte de l'inuline. Compt. rend. CXVI, 1893, S. 1143.

BRUNSTEIN, A.

1901. Über Spaltung von Glucosiden durch Schimmelpilze. Bot. Centralbl., Beihefte, Bd. X, 1901, S. 1.

BUTKEWITSCH, WL.

1903. Umwandlung der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwickelung. Pringsh. Jahrb. f. wiss. Botanik, Bd. XXXVIII, 1903, S. 147.

Czapek, F.

1901. Zur Kenntniss der Stickstoffversorgung und Eiweissbildung bei *Aspergillus niger*. Ber. d. deutsch. Bot. Gesellsch., Bd. XIX, 1901, Generalvers. heft, S. [130].

1902 a. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung der Pflanzen. 1. Die Bedeutung der Aminosäuren als Stickstoffquelle bei Schimmelpilzen. Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. I, 1902, S. 538.

1902 b. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung d. Schimmelpilze. 2. Über die Verwendbarkeit von Aminen, Amiden und Ammoniaksalzen zum Eiweissaufbau bei *Aspergillus niger* v. Thiegh. Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. II, 1902, S. 557.

1902 c. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung der Schimmelpilze. 3. Die Verarbeitung von Nitro- und Hydrazinderivaten und von aromatischen Stickstoffverbindungen. — Schlussbetrachtungen. Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. III, 1902, S. 47.

Dean, A. L.

1903. Experimental studies on Inulase. Bot. Gazette, Vol. XXXV, 1903, S. 24.

Devaux.

1903. Soc. phys. nat. de Bordeaux. T. III, 1903.

Diakonow, N. W.

1887. Organische Substanz als Nährsubstanz. Ber. d. deutsch. Bot. Gesellsch., Bd. V, 1887, S. 380.

Ehrenberg, P.

1907. Die Bewegung des Ammoniakstickstoffes in der Natur. Berlin 1907.

Emmerling, O.

1902. Aminosäuren als Nährstoffe für niedere Pflanzen. Ber. d. deutsch. Chem. Gesellsch., Bd. XXXV, 1902, S. 2289.

1903. Oxalsäuregärung durch Schimmelpilze. Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., Bd. X, 1903, S. 273.

Euler, H.

1908. Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie. Braunschweig 1908.

Gérard, E.

1896. Fermentation de l'acide urique par les microorganismes. Compt. rend. T. CXXII, 1896, S. 1019 und T. CXXIII, S. 185.

Grüss, J.

1902. Biologische Erscheinungen bei der Kultivierung von *Ustilago Maydis*. Ber. d. deutsch. Bot. Gesellsch. Bd. XX, 1902, S. 212.

Hagem, Oscar.

1908. Untersuchungen über norwegische Mucorineen. I. Videnskabsselskabets Skrifter. I. Math.-Naturv. Klasse. 1907. No. 7. Kristiania.

1910. Neue Untersuchungen über norwegische Mucorineen. Annales Mycologici. Vol. VIII, 1910, S. 265.

Hansen, E. Chr.

1902. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi. Særtryk af Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet. 5te Bd., 2det Hefte.

Hauman, L.

1902. Étude microbiologique et chimique du rouissage aérobie du lin. Annal. de l'Instit. Pasteur, T. XVI, 1902, S. 379.

van Iterson, C., jr.

1904. Die Zersetzung von Cellulose durch aërobe Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., 1904, S. 689.

Kean, A. L.

1890. On the nature of certain plant diseases. Bot. Gazette, Vol. XV, 1890, S. 171.

Laurent, Emile.

1889. Recherches sur la valeur comparée des Nitrates et des sels ammoniacaux comme aliment de la levûre de bière et de quelques autres plantes. Annal. de l'Instit. Pasteur. T. III, 1889, p. 362.

Lendner, Alfred.
1905. Deux Mucorinées nouvelles. Bull. de l'Herb. Boissier, 2me Série, T. V, 1905.
1907. Sur quelques Mucorinées. Bull. de l'Herb. Boissier, 2me Série, T. VII, 1907.
1908 a. Recherches histologiques sur les zygospores du *Sporodinia Grandis*, Mucorinées nouvelles. Bull. de l'Herb. Boissier, 2me Série, T. VIII, 1908.
1908 b. Les Mucorinées de la Suisse. Matériaux pour la Flore Cryptogamique Suisse. Vol. III, Fascicule 1. Berne 1908.
Malencovič, B.
1905. Einige Daten über die Vergärbarkeit des Zylans. Naturw. Zeitschr. f. Land- u. Forstwirtsch., Jahrb. III, 1905, p. 515.
Malfitano, G.
1900 a. La protéolyse chez l'*Aspergillus niger*. Annal. de l'Institut Pasteur, T. XIV, 1900, No. 2, S. 60.
1900 b. Sur la protéase de l'*Aspergillus niger*. 2e mémoire. Annal. de l'Instit. Pasteur, T. XIV, 1900, No. 6, S. 420.
Marchal, E.
1893. Sur la production de l'ammoniaque dans le sol par les microbes. Bull. Acad. Roy. Belgique XXV, 1893, S. 727. — Siehe auch Agricult. Science, Vol. VIII, 1894, S. 574 und Referat in Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., 1895, Bd. I, S. 753.
Miehe, H.
1907. Die Selbsterhitzung des Heus. Jena 1907.
Molisch, H.
1894. Die mineralische Nahrung der niederen Pilze. I. Sitzungsber. k. Akad. Wiss., Wien, mathem.-naturw. Cl., C. III, 1894, 1. Abt. S. 554.
Möller, A.
1903. Untersuchungen über ein- und zweifährige Kiefern im märkischen Sandboden. Zeitschr. f. Forst- u. Jagdwesen. 1903, Hft. 5—6.
Naegeli, Carl Wilhelm, von.
1880. Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen. Sitz. ber. d. math.-phys. Kl. d. K. bayer. Akad. d. Wiss., X, 1880, S. 277.
Namyslowski, B.
1906. *Rhizopus nigricans* et les conditions de la formation de ses zygospores. Bull. intern. de l'Académie des sciences de Cracovie. Class. math. et nat. No. 7. Juillet 1906.
Nikitinsky, Jacob.
1904. Über die Beeinflussung der Entwickelung einiger Sehimmelpilze durch ihre Stoffwechselsprodukte. Pringsheims Jahrbücher f. wiss. Botanik, Bd. XL, 1904, S. 1.
Oudemans, C. A. J. A. und Koning, C. J.
1902. Prodrome d'une Flore mycologique obtenue par la culture sur gélatine préparée de la terre humeuse du Spanderswoud, près la Bussum. Arch. Neerland. des sc. exact. et natur., 2. ser., T. VII, 1902, S. 266.
Puriewitsch, Konstantin.
1898. Über die Spaltung der Glykoside durch die Schimmelpilze. Ber. d. deutsch. Bot. Gesellsch., Bd. XVI, 1898, S. 368.
Raciborski, M.
1906. Über die Assimilation der Stickstoffverbindungen durch Pilze. Bull. intern. de l'Académie des sciences de Cracovie. Class. math. et nat. No. 8, Octobre 1906. S. 733.
Schornstein, J.
1902. Zur Biochemie der Holzpilze. Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., Bd. IX, 1902, S. 446.
Schroeter, Josef.
1886. Über die auf Hutpilzen vorkommenden Mucorineen. 64. Jahresber. Schles. Gesellsch. f. vaterl. Cult., 1886, S. 183.
Shibata, K.
1904. Über das Vorkommen von Amide spaltenden Enzymen bei Pilzen. Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. V, 1904, S. 384.

TREBOUX.

1904. Zur Stickstoffernährung der grünen Pflanze. Ber. d. deutch. Bot. Gesellsch., Bd. XXII, 1904, S. 570.

VUILLEMIN, P.

1903. Le genre *Tieghemella* et la Série des Absidiées. Bull. Soc. myc. de France. T. XIX, S. 119.

1907. Sur le *Dicranophora fulva* SCHROET. Annales Mycologici. Vol. V, 1907, S. 33.

WARD, MARSHALL.

1888. A lily-disease. Ann. of Botany, Vol. II, 1888—89, S. 319.

WEHMER, C.

1903. Der Mucor der Hanfrötte, *Mucor hiemalis* nov. sp. Annales Mycologici, 1903, S. 37.

WEIS, FR.

1908. Om Salpetersyrens Forekomst og Dannelse i Muld og Mor. P. E. MÜLLER og FR. WEIS: Studier over Skov- og Hedejord. II. Det forstlige Forsøksvæsen, II, 1908, Kjøbenhavn.

WENT, F. A. S. und PRINSEN GEERLIGS, H. C.

1895 a. Beobachtungen über die Hefearten und zuckerbildenden Pilze der Arrakfabrikation. Verhandeling. d. koninkl. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam, Ser. II, Teil 4, No. 2, 1895. Nur Referat gesehen (Centralbl. f. Bakt. u. Par., Bd. I, 1895, S. 501).

1895 b. Over suiker en alkoholvorming door organismen in verband met de verwerking der naproducten in de rietsuikerfabriken. Medeelingen van het proefstation voor suikerriet in West-Java te Kagok-Tegal, 1895. Nur Referat gesehen (Centralbl. f. Bakt. u. Par., Bd. I, 1895, S. 504).

WINOGRADSKY, S. und OMELIANSKY, V.

1899. Über den Einfluss der organischen Substanzen auf die Arbeit der nitrifizierenden Mikrobien. Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., Bd. V, 1899, S. 329.

WIŚNIEWSKI, P.

1908. Einfluss der äusseren Bedingungen auf die Fruchtform bei *Zygorhynchus Moelleri* VUILL. Bull. intern. de l'Académie des sciences de Cracovie. Class. math. et nat. Juillet 1908, S. 656.

Gedruckt 7. September 1910.